

# **Untersuchungen zu möglichen Bindungs- und Aktivierungsfaktoren der zellulären Immunantwort bei *Manduca sexta* L.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften

angefertigt am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
**Christine Lesch**

Dekan: Prof. Dr. J. Mayer  
Erstgutachterin: Prof. Dr. T. Trenczek  
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Dorresteyn

Gießen, im Januar 2005



Was die Raupe „Ende der Welt“ nennt,  
nennt der Rest der Welt „Schmetterling“.

Laotse





## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acids</i> (Aminosäuren)
AC-Saline	<i>M. sexta</i> -Antikoagulanzen-Saline
A. deion.	über Ionenaustauscher einfach deionisiertes Wasser
Bm	<i>Bacillus megaterium</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
C-terminal	carboxyterminal (in Bezug auf eine Aminosäuresequenz)
Cy3	Indocarbocyanin 3
dpi	<i>dots per inch</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GR	Granuläre Zelle/n
h	Stunde(n)
HEL	Hühnereiweißlysozym
Kap.	Kapitel
LB	Luria Bertani
Lxdy	x. Larvenstadium y. Tag (z. B. L5d2: 5. Larvenstadium 2. Tag)
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
mAks	monoklonale Antikörper
min	Minute(n)
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	über Ionenaustauscher und „Milli-Q-Anlage“ aufbereitetes Wasser
MI	<i>Micrococcus luteus</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS <sup>+</sup>	<i>M. sexta</i> -Vollsaline
MS <sup>-</sup>	<i>M. sexta</i> -Calcium-Magnesium-freie Saline
MWr	relatives Molekulargewicht
N	normal (normale Lösung)
n	Anzahl der Tiere
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal (in Bezug auf eine Aminosäuresequenz)

OD	optische Dichte
OE	Oenozytoid/e
PAMPs	<i>pattern associated molecular patterns</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
p. i.	<i>post injectionem</i> (nach der Injektion; z. B. 5 h p. i.: 5 h nach der Injektion)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PG	Peptidoglukan
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PI	Propidiumjodid
pI	isoelektrischer Punkt
PL	Plasmatozyte/n
PRPs	<i>pattern recognition proteins</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q <sub>25</sub> bzw. Q <sub>75</sub>	1. bzw. 3. Quartil
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
± s	Standardabweichung
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SG	Sammelgel
SM-Puffer	<i>Sodium-Magnesium</i> Puffer
SP	Sphärule Zelle/n
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TG	Trenngel
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
ub	unbehandelt
ÜN	über Nacht
x g	Erdbeschleunigung
<	weniger als bzw. kleiner als
>	mehr als bzw. größer als
≡	etwa gleich

Dezimale Vielfache und Teile von Maßeinheiten, wie z. B. Milli, Mikro oder Kilo, sowie ihre Vorsetzzeichen richten sich nach dem seit dem 1. Januar 1978 in der Bundesrepublik Deutschland gültigen Internationalen Einheitensystem (SI).

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure bzw. Aspartat
E	Glu	Glutaminsäure bzw. Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

X nicht definierte Aminosäure

Dap Diaminopimelinsäure (bei Bakterien)

Symbole für Nukleotide bzw. Basen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
N	nicht definierte Base



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die zelluläre Immunantwort	1
1.2	Die humorale Immunantwort	3
1.2.1	Die Immunproteine	3
1.2.2	Genregulation der Expression antimikrobieller Proteine und Peptide über Toll- und Imd-Weg	5
1.2.3	Melanisierung und Prophenoloxidasekaskade	8
1.2.4	Weitere Faktoren der humoralen Immunantwort	9
1.3	Welche Komponenten und Prozesse spielen bei der Auslösung zellulärer bzw. humoraler Immunreaktionen eine Rolle?	10
1.3.1	Oberflächenkomponenten von Bakterien und Pilzen, die als PAMPs dienen können	10
1.3.2	<i>Pattern recognition proteins</i> bei Insekten	12
1.4	Annexine	16
1.4.1	Nomenklatur und minimale Charakteristika der Annexine	16
1.4.2	Struktur der Annexine	18
1.4.3	Vorkommen von Annexinen bei Insekten	20
1.4.4	Eigenschaften von Annexinen	20
1.5	Alternatives Exon-Spleißen	22
1.6	Zielsetzung der Promotionsarbeit	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Chemikalien und allgemeine Verfahren	27
2.1.3	Der Versuchsorganismus <i>Manduca sexta</i>	28
2.1.4	Bakterienstämme	29
2.1.5	Antikörper	30
2.1.6	Häufig verwendete Lösungen	31
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zucht von <i>M. sexta</i>	33
2.2.2	Kultivierung von Bakterien	35
2.2.3	Hybridomazellkultur-Arbeiten	37

2.2.4 Gewinnung von Hämozyten und Plasma aus der Hämolymphe von <i>M. sexta</i> .....	40
2.2.5 Herstellung von Hämozyten- und Fettkörperlysat für die Gelelektrophorese .....	42
2.2.6 Injektionsversuche .....	42
2.2.6.1 Herstellung der Injektionssuspensionen .....	43
2.2.6.1.1 Herstellung von Bakteriensuspensionen zur Injektion .....	43
2.2.6.1.2 Herstellung von Suspensionen verschiedener Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien zur Injektion .....	45
2.2.6.1.3 FITC-Markierung von Bakterien für Injektionsversuche .....	47
2.2.6.2 Injektion verschiedener Provokatoren in <i>M. sexta</i> .....	48
2.2.7 Bestimmung von antibakterieller bzw. lytischer Aktivität (Hemmhoftests) .....	48
2.2.8 Immunhistochemie .....	50
2.2.8.1 Herstellung von Hämozyten-Monolayern .....	50
2.2.8.2 Präparation von Geweben und Organen (Whole-mount-Präparate) .....	51
2.2.8.3 Anfertigung von Ganztierschnitten (Histologie) .....	52
2.2.9 Versuche zur Phagozytose von Bakterien .....	53
2.2.9.1 Phagozytose-Assay mit Hämozyten von <i>M. sexta</i> .....	53
2.2.9.2 Phagozytose-Versuche <i>in vivo</i> .....	54
2.2.9.3 Quenching .....	55
2.2.10 Untersuchung von Hämozyten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	56
2.2.11 Affinitätspräzipitation (Bakterienbindungs-Assay) .....	57
2.2.11.1 Prinzipielles Verfahren der Affinitätspräzipitation .....	58
2.2.11.2 <i>In-vitro</i> -Versuche zur Lyse von <i>M. luteus</i> .....	60
2.2.11.3 Hemmung des Lysozymverdaus mit Imidazol bzw. Histamindihydrochlorid .....	61
2.2.12 Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) .....	62
2.2.13 Western-Blotting-Verfahren .....	65
2.2.14 Molekulargewichtsbestimmung .....	67
2.2.15 Screening von cDNA-Expressionsbanken mit monoklonalen Antikörpern .....	68
2.2.15.1 Titration der cDNA-Banken .....	68
2.2.15.2 Erstes Screening der cDNA-Banken mit einem monoklonalen Antikörper .....	70
2.2.15.3 Zweites und weitere Screenings der potentiell positiven Klone .....	71
2.2.15.4 <i>In-vivo</i> -Exzision (Einzelklon-Exzision) der Phagemide .....	72
2.2.16 Bestimmung der Insertgröße ausgewählter Klone .....	73
2.2.16.1 Präparation der Plasmid-DNA .....	74
2.2.16.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	74
2.2.16.3 PCR zur Bestimmung der Insertgröße ausgewählter Klone .....	74

2.2.16.4 Agarosegel-Elektrophorese .....	75
2.2.17 Erstellen einer EST-Bank .....	77
2.2.18 DNA-Sequenzierung .....	78
2.2.19 Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung mit bioinformatischen Methoden (Sequenzvergleiche) .....	78
2.2.20 Untersuchung des Annexin IX-Gens von <i>M. sexta</i> .....	79
2.2.20.1 Gewinnung genomischer DNA aus Hämocyten als Matrice für die PCR .....	80
2.2.20.2 Primer Design und Synthese .....	81
2.2.20.3 Durchführung der PCR .....	81
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>83</b>
<b>3.1 Analysen der Provokatorkompetenz verschiedener Bakterien bzw. isolierter bakterieller Komponenten zur Auslösung einer Immunantwort bei <i>M. sexta</i> .....</b>	<b>83</b>
3.1.1 Auswertung der Hemmhoftests zur Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität gegen <i>M. luteus</i> .....	83
3.1.2 Vergleich der Proteinmuster zellfreier Hämolymphe von unbehandelten und Bakterien-infizierten <i>M. sexta</i> -Larven (SDS-PAGE) .....	87
3.1.3 Nachweis von Hämolin und Lysozym in der Hämolymphe von <i>M. sexta</i> -Larven mit dem Western-Blotting-Verfahren .....	89
3.1.4 Nachweis von Attacin, Hämolin und Lysozym in den Hämocyten von <i>M. sexta</i> -Larven (Monolayer) .....	90
<b>3.2 Untersuchungen über den Verbleib injizierter Bakterien und den Verlauf der zellulären Abwehr .....</b>	<b>91</b>
3.2.1 Beobachtungen an Hämocyten und Fettkörpern von <i>M. sexta</i> -Larven nach Injektion verschiedener Bakterien .....	92
3.2.2 Nachweis der Phagozytose von <i>B. megaterium</i> durch Hämocyten von <i>M. sexta</i> -Larven .....	100
3.2.2.1 Quenching mittels Trypanblau resp. Propidiumjodid .....	100
3.2.2.2 Nachweis der Phagozytose von <i>B. megaterium</i> durch Hämocyten von <i>M. sexta</i> mittels Transmissionselektronenmikroskopie .....	100
<b>3.3 Nachweis potenzieller Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien in der Hämolymphe von <i>M. sexta</i> .....</b>	<b>108</b>
3.3.1 Problematik von <i>M. luteus</i> als Affinitätsmatrix .....	108
3.3.2 Hemmung des Lysozym-Verdaus von <i>M. luteus</i> durch Imidazol bzw. Histamin .....	111
3.3.3 Affinitätspräzipitation mit <i>M. luteus</i> als Matrix und Histamin als Hemmstoff .....	113
3.3.4 Affinitätspräzipitation mit <i>B. megaterium</i> als Matrix .....	113

<b>3.4 Identifizierung und Charakterisierung der für eine zelluläre Immunabwehr möglicherweise notwendigen Hämozytenproteine mittels monoklonaler Antikörper .....</b>	<b>115</b>
3.4.1 Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper für das Screening von cDNA-Banken .....	115
3.4.2 Screening von Hämozyten- und Fettkörper-cDNA-Bank mit monoklonalen Antikörpern .....	116
3.4.3 Datenbank-Recherchen .....	124
3.4.4 Vergleichende Analysen der Sequenzen verschiedener Annexin IX-Klone von <i>M. sexta</i> .....	127
3.4.5 Charakterisierung des <i>M. sexta</i> -Annexin IX .....	129
3.4.5.1 Molekulargewichtsbestimmung und Ermittlung des isoelektrischen Punktes .....	129
3.4.5.2 Western Blot mit Hämozyten- und Fettkörperlysate .....	129
3.4.5.3 Eingrenzung der potentiellen Antikörperbindungsstelle durch Sequenzvergleiche .....	131
3.4.5.4 Überprüfung der <i>M. sexta</i> -Annexin IX-Sequenz auf das Vorhandensein eines Signalpeptids .....	131
3.4.5.5 Voraussage über das Vorhandensein von $\alpha$ -Helices .....	132
3.4.5.6 Untersuchungen zur Hydrophobizität und zum Vorhandensein von Transmembranbereichen .....	132
3.4.5.7 Untersuchung der putativen Isoform A des <i>M. sexta</i> -Annexin IX auf Exon-Intron-Spleißstellen bzw. solche für alternatives Spleißen .....	134
3.4.6 Immunhistologischer Nachweis von Annexin IX in verschiedenen Geweben von <i>M. sexta</i> .....	137
3.4.6.1 Nachweis von Annexin IX in Hämozyten .....	137
3.4.6.1.1 Vergleich von Hämozytenmonolayern unbehandelter <i>M. sexta</i> Larven mit solchen, denen <i>B. megaterium</i> injiziert worden war .....	137
3.4.6.1.2 Hämozyten-Monolayer nach Phagozytose von Hefe (in-vitro-Phagozytose-Assay) .....	140
3.4.6.2 Nachweis von Annexin IX in anderen Geweben .....	140
3.4.6.2.1 Whole mount Präparationen von Fettkörper, Integumentinnenseite und Darmepithel .....	140
3.4.6.2.2 Nachweis von Annexin IX auf Ganztierschnitten .....	142
<b>3.5 Ampifizierung eines Sequenzabschnitts im C-Terminus des Annexin IX-Gens aus Hämozyten von <i>M. sexta</i> .....</b>	<b>142</b>
<b>3.6 Ergebnisse des EST-Projekts .....</b>	<b>143</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>144</b>
<b>4.1 Provokatorkompetenz von Bakterien und isolierten bakteriellen Komponenten zur Auslösung einer Immunantwort bei <i>M. sexta</i> .....</b>	<b>144</b>
4.1.1 Überprüfung der Provokatorkompetenz Gram-positiver Bakterien bzw. deren Oberflächenkomponenten mit Hemmhoftests .....	145



4.1.2	Gelelektrophoretischen Analysen und Western Blot zur Überprüfung der Provokatorkompetenz .....	149
4.1.3	Nachweis von antimikrobiellen Proteinen bzw. Peptiden in Hämozyten von <i>M. sexta</i> -Larven .....	152
<b>4.2</b>	<b>Phänomene der zellulären Abwehr und ihr zeitlicher Verlauf nach Injektion von Gram-positiven Bakterien in <i>M. sexta</i>-Larven .....</b>	<b>152</b>
4.2.1	Verbleib von <i>B. megaterium</i> im Hämozöl von <i>M. sexta</i> -Larven nach der Injektion .....	153
4.2.2	Verbleib von <i>M. luteus</i> im Hämozöl von <i>M. sexta</i> -Larven nach der Injektion .....	155
4.2.3	Nachweis der Phagozytose von <i>B. megaterium</i> durch Hämozyten von <i>M. sexta</i> .....	156
<b>4.3</b>	<b>Potenzielle Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien aus der Hämolymphe von <i>M. sexta</i>-Larven .....</b>	<b>158</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick: PGRPs bei <i>M. sexta</i> .....</b>	<b>161</b>
<b>4.5</b>	<b>Screening der Hämozyten- und der Fettkörper-cDNA-Bank von <i>M. sexta</i> mit monoklonalen Antikörpern – Methodenkritik .....</b>	<b>162</b>
<b>4.6</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung des <i>M. sexta</i>-Annexin IX .....</b>	<b>163</b>
4.6.1	Beurteilung der sequenzierten MS#78-positiven Klone .....	163
4.6.2	Identifizierung potenziellen <i>M. sexta</i> -Annexin IX-Isoformen .....	165
4.6.2.1	Kurze Darstellung des <i>B. mori</i> -Annexin IX .....	165
4.6.2.2	Vergleich des <i>B. mori</i> -Annexin IX mit dem von <i>M. sexta</i> .....	166
4.6.3	Charakterisierung des <i>M. sexta</i> -Annexin IX .....	167
4.6.3.1	Entstehung von drei Isoformen des <i>M. sexta</i> -Annexin durch alternatives Spleißen .....	168
4.6.3.2	Untersuchung des potenziellen Introns in Klon MH6/1-8i1 .....	170
4.6.3.3	Molekulargewicht, isoelektrischer Prunkt und Hydrophobizität des <i>M. sexta</i> -Annexin IX .....	172
4.6.3.4	Annexin-Domänen und Bindungsmotive .....	174
4.6.4	Nachweis von Annexin IX bei <i>M. sexta</i> und anderen Insekten .....	177
4.6.5	Betrachtungen zur potenziellen Funktion von Annexin .....	180
4.6.6	Ausblick der Annexin-Untersuchungen .....	181
<b>4.7</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse des EST-Projekts .....</b>	<b>181</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>188</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>190</b>

<b>7 Anhang A .....</b>	<b>A1</b>
Tab. A1 .....	A 1
Tab. A2 .....	A 1
Tab. A3 .....	A 2
Tab. A4 .....	A 3
Abb. A1 .....	A 4
Abb. A2 .....	A 5
Abb. A3 .....	A 5
Abb. A4 .....	A 6
Abb. A5 .....	A 6
Abb. A6 .....	A17
Abb. A7 .....	A27
Abb. A8 .....	A47
Abb. A9 .....	A49
Abb. A10 .....	A51
Abb. A11 .....	A52
 <b>8 Anhang B .....</b>	 <b>B1</b>
Tab. B1 .....	B1

Danksagung

Erklärung

# 1 Einleitung

Insekten gehören zu den erfolgreichsten Tiergruppen der Erde. Sie kommen in fast allen Lebensräumen mit Ausnahme der Ozeane vor. Sie sind wichtige Nützlinge (Blütenbestäuber), aber auch als direkte (Vorratsschädlinge) und indirekte Schädlinge (Überträger von Krankheiten) haben sie große Bedeutung. Ihr Erfolg beruht dabei nicht nur auf effektiven Reproduktionsstrategien, sondern auch auf Mechanismen, widrigen Umständen wirksam zu begegnen. So besitzen sie die Kompetenz, eine mikrobielle Infektion oder Parasitierung überstehen zu können.

Bei den meisten Insekten ist bereits die chitinhaltige Kutikula ein recht guter mechanischer Schutz gegen eindringende Pathogene. Auch der zarte Mitteldarm ist mit einem Chitinnetzwerk, der peritrophischen Membran, geschützt. Das Eindringen von Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen, Viren, Protozoen, Nematoden oder Parasitoiden in das Hämozöl kann jedoch über diverse Körperöffnungen erfolgen, z. B. Mund, After, Tracheen, nach der Passage über das Darmepithel und andere Poren, z. B. auf den Antennen, oder über eine Wunde, bei der die Kutikula zerstört ist.

Die Insektenimmunologie befasst sich mit den für Insekten typischen endogenen Abwehrmechanismen gegen Pathogene. Man unterscheidet zelluläre und humorale Abwehrkomponenten (GILLESPIE et al. 1997, VILMOS & KURUCZ 1998).

Während das Immunsystem der Vertebraten sowohl aus einem angeborenen als auch einem adaptiven Teil besteht, beruht der Infektionsschutz bei Insekten nur auf evolutiv älteren angeborenen Immunitätsmechanismen wie beispielsweise Phagozytose, Einkapselungsreaktionen, Koagulationsvorgängen und antimikrobiell wirkenden Faktoren. Insekten stehen keine Antikörper zur Bekämpfung von „Fremd“ zur Verfügung und sie besitzen keine Gedächtniszellen.

## 1.1 Die zelluläre Immunantwort

Die zellulären Immunreaktionen der Insekten werden durch die Blutzellen der Insekten, die Hämozyten, vermittelt. Bei Lepidopteren wie dem Tabakschwärmer *Manduca sexta* unterscheidet man morphologisch fünf Typen (HOROHOV & DUNN 1982, WILLOTT et al. 1994): Plasmatozyten, Granuläre Zellen, Sphärule Zellen,

Oenozytoide und Prohämozyten. Prohämozyten gelten als die Vorläuferzellen, aus denen sich die anderen Hämozytentypen entwickeln.

Die wichtigsten Funktionen der Hämozyten sind Phagozytose, Knötchenbildung und Einkapselung. Sie sind außerdem an der Wundheilung, der Hämolympenkoagulation, dem Aufbau von extrazellulärer Matrix und der Sezernierung humoraler Faktoren beteiligt (GILLESPIE et al. 1997).

Eine der ersten Reaktionen von Hämozyten nach einer Fremderkennung ist die Anheftung bzw. das Spreiten, insbesondere von Granulären Zellen und Plasmatozyten, was bis zur Ausbildung von Netzwerken und Aggregaten führen kann (GILLESPIE et al. 1997).

Bei der **Phagozytose** werden kleine Partikel wie Bakterien und Hefen aufgenommen und anschließend intrazellulär verdaut. An der Phagozytose sind überwiegend Granuläre Zellen und Plasmatozyten beteiligt (RATCLIFFE & ROWLEY 1979, WAGO & ICHIKAWA 1979). Abhängig von der Art des Injektionsmaterials kann sich dabei die Zahl der frei in der Hämolymphe zirkulierenden, aber auch der adhärennten Hämozyten verändern (ANDERL 2001). Für *M. sexta* wurde nachgewiesen, dass Hefe *in vitro* fast ausschließlich von Plasmatozyten phagozytiert wird (GRIGAT 2003), *B. megaterium* (ANDERL 2001) und Latexkügelchen (GRIGAT 2003) *in vivo* von Granulären Zellen und von Plasmatozyten und chinesische Tusche (ANDERL 2001) zusätzlich von Oenozytoiden.

Durch die **Knötchen- bzw. Nodulibildung** werden kleine Fremdkörper oder auch größere Mengen an Bakterien in einem Koagulum aus Hämozyten und HämolympHKomponenten verklumpt und damit aus dem Kreislauf entfernt (LACKIE 1988, RATCLIFFE & ROWLEY 1979). Zu den HämolympHKomponenten, die an der Verklumpung beteiligt sein können, zählen bei *M. sexta* die induzierbaren Scolexine (KYRIAKIDES et al. 1995, FINNERTY et al. 1999) und das Hämagglutinin M13 (MINNICK et al. 1986). Hämoлектin von *Drosophila melanogaster* (GOTO et al. 2001) und Hämocytin von *Bombyx mori* (KOTANI et al. 1995) sind bekannte *clotting*-Proteine. Die Beteiligung weiterer Proteine (Tiggrin sowie die Genprodukte von CG15825 und CG15293) an *clotting*-Vorgängen bei *D. melanogaster* wurde kürzlich von SCHERFER et al. (2004) nachgewiesen.

Sind die eingedrungenen Fremdkörper größer, wie z. B. Parasiteneier oder Nematoden, werden sie von mehreren Schichten von Hämozyten **eingekapselt**.

Bei *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera) lagern sich zunächst Granuläre Zellen an den Fremdkörper an, es folgen mehrere Schichten von Plasmatozyten und danach eine weitere Schicht einer bestimmten Subpopulation Granulärer Zellen (). Abschließend wird eine Schicht extrazellulären Materials aufgelagert (PECH & STRAND 1996, PECH & STRAND 2000). Der eingekapselte Fremdkörper verbleibt im Hämözöl oder in Gewebespalten. An der Einkapselung sind bei *M. sexta* ebenfalls überwiegend Plasmatozyten beteiligt aber auch Granuläre Zellen (GILLESPIE et al. 1997, WIEGAND et al. 2000).

Vorbedingung für Knötchenbildung und Einkapselung scheinen Koagulationsprozesse zu sein (RATCLIFFE 1986).

## **1.2 Die humorale Immunantwort**

Die humorale Immunantwort umfasst antimikrobiell wirkende Proteine, die Prophenoloxidasekaskade, Koagulationsfaktoren sowie verschiedenen Aktivatoren, Modulatoren und Inhibitoren (GILLESPIE et al. 1997).

### **1.2.1 Die Immunproteine**

Das Auftreten der Immunproteine bzw. eine Erhöhung ihrer Konzentration in der Hämolymphe gilt als Nachweis für eine Immunreaktion. Antimikrobiell wirkende Proteine und Peptide sowie das Hämolympheprotein Hämolin besitzen eine antibakterielle und z. T. antifungale Wirkung (HOFFMANN 1995, BOMAN 1996, HULTMARK 1996, BULET et al. 1999, ENGSTRÖM 1999). Die Synthese von Immunproteinen ist dosis- und z. T. provokatorabhängig und kann von Insektenart zu Insektenart unterschiedlich ausgeprägt sein (DUNN 1986, GILLESPIE et al. 1997). Ebenso wie die Aktivierung der zellulären Abwehrreaktionen wird sie durch eine Infektion mit Bakterien und Hefen bzw. deren Zellwandkomponenten, aber auch durch andere partikuläre Suspensionen induziert. Dies wurde beispielsweise in einer vergleichenden Studie bei *B. mori* nachgewiesen (MORISHIMA et al. 1992). Immunproteine werden vor allem im Fettkörper synthetisiert, aber auch Epidermis und Nervengewebe und besonders die Hämocyten sind dazu befähigt (MULNIX & DUNN 1994, TRENCZEK 1998). Einige Immunproteine bzw. -peptide werden nachfolgend beispielhaft erläutert:

**Lysozym** (MW<sub>r</sub> = ca. 14 k) kommt bei fast allen Insekten vor und lysiert die Zellwand vornehmlich von Gram-positiven Bakterien. Dabei spaltet es die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuramin und N-Acetylglucosamin des Peptidoglukans (SCHLEGEL 1992). Bei Insekten wie beispielsweise *Anopheles*, *Hyalophora* oder *Drosophila* aber auch bei *Gallus domesticus* weist es N-terminal ein ca. 20 Aminosäuren (aa) langes Signalpeptid auf (KANG et al. 1996).

**Cecropine** (MW<sub>r</sub> = ca. 4 k) bzw. Cecropin-ähnliche Peptide finden sich bei Lepidopteren und Dipteren. Die Peptide zerstören die Zellwand sowohl Gram-negativer als auch Gram-positiver Bakterien. Ihre Synthese wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen (STEINER et al. 1981, DICKINSON et al. 1988, TRENCZEK & FAYE 1988, BREY et al. 1993).

Insekten-**Defensine** (MW<sub>r</sub> = ca. 4 k) sind nur für Dipteren nachgewiesen und wirken auf Gram-positive Bakterien. So ist Defensin bei *Aedes aegypti* eines der wichtigsten induzierbaren Immunpeptide, dessen Aktivität gegen Gram-positive Bakterien *in vitro* nachgewiesen wurde (BARTHOLOMAY et al. 2004). Cecropine weisen eine  $\alpha$ -helikale Konformation auf, während Insekten-Defensin und Drosomycin (siehe unten) eine zyklische Struktur mit drei bzw. vier Disulfidbrücken besitzen (BULET et al. 2004).

**Attacine** (MW<sub>r</sub> = ca. 20 k, Vorkommen: Diptera und Lepidoptera) bzw. Attacin-ähnliche Proteine wie z. B. Dipteracin (MW<sub>r</sub> = ca. 9 k, Vorkommen: Diptera), wirken auf Gram-negative Bakterien. Attacin interferiert mit der Synthese der *outer membrane proteins* (OMPs) in der äußeren Membran (CARLSSON et al. 1998), ebenso wie Gloverin (MW<sub>r</sub> = ca. 14 k), ein bei Lepidopteren vorkommendes Glycin-reiches Protein (AXÉN et al. 1997).

**Drosocin** (MW<sub>r</sub> = ca. 5 k) zählt zu den Prolin-reichen Peptiden der Dipteren, das eine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien aufweist (HOFFMANN 1995).

**Drosomycin** (MW<sub>r</sub> = ca. 5 k) kommt ebenfalls bei Dipteren vor. Es wirkt antifungizid, weist jedoch keine antibakterielle Aktivität auf. Es wurde bei *D. melanogaster* nach Infektion mit verschiedenen Pilzen nachgewiesen. Wie die anderen Immunproteine wird es im Fettkörper synthetisiert und in die Hämolymphe sezerniert (FEHLBAUM et al. 1994).

Inzwischen sind viele hundert antimikrobielle Peptide nicht nur bei Insekten bekannt (<http://aps.unmc.edu>).

Das Immunprotein **Hämolin** (syn. P4, MW<sub>r</sub> = 47-48 k), das für immunisierte *H. cecropia* (RASMUSON & BOMAN 1979, ANDERSSON & STEINER 1987, TRENCZEK & FAYE 1988) und *M. sexta* (LADENDORFF & KANOST 1991) nachgewiesen wurde, gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besitzt vier Ig-Domänen (SUN et al. 1990). Es wird jedoch nicht nur im Verlauf einer Immunantwort exprimiert, sondern auch in Embryonen sowie vor und während der Metamorphose (BETTENCOURT et al. 2000, YU & KANOST 1999). Es bindet an Hämozyten und Bakterien und verhindert die Aggregation der Hämozyten (LADENDORFF & KANOST 1991). Nach YU & KANOST (2002) bindet es bei *M. sexta* sowohl an Gram-negative als auch an Gram-positive Bakterien sowie an Hefen, so dass es zur Agglutination derselben kommt. Die Bindung an die Bakterien geschieht über LPS bei Gram-negativen Bakterien sowie Lipoteichonsäuren und Peptidoglykan bei Gram-positiven Bakterien. Dabei weist die Bindung des Hämolins an Lipoteichonsäuren eine höhere Affinität auf als an LPS. Bei Hefen scheint die Bindung über Mannan und über das  $\beta$ -1,3-Glukan vermittelt zu sein. Hämolin wird aufgrund seiner Bindungsfähigkeit an Bakterien auch als sog. *pattern recognition protein* (PRP) angesehen (siehe Kap. 1.3.2).

### 1.2.2 Genregulation der Expression antimikrobieller Proteine und Peptide über Toll- und Imd-Weg

Die Zellen, die antimikrobielle Proteine bzw. Peptide synthetisieren – beispielsweise Fettkörperzellen –, müssen extrazelluläre Signale erhalten und diese in einer Signalkaskade bis zum Zellkern weiterleiten, damit dort die Transkription von Immungenen induziert wird. Bei *Drosophila* geschieht dies über den Toll- und den Imd (*Immune deficiency*)-Signalweg (Toll/Dif (*Dorsal-related immunity factor*)- bzw. Imd/Rel (*Relish*)-Weg), deren Endglieder Transkriptionsfaktoren sind, die der Rel-Proteinfamilie (den NF- $\kappa$ B-Proteinen der Mammalia verwandt) angehören. Der Toll-Signalweg (Toll/Dorsal) wurde ursprünglich bei Untersuchungen zur Entwicklung der Dorsoventralpolarität bei *Drosophila*-Embryonen entdeckt (ANDERSON et al. 1985).

Bei *D. melanogaster* sind die beiden Signaltransduktionskaskaden in den letzten Jahren intensiv von verschiedenen Arbeitsgruppen, insbesondere denen um Jules A. Hoffmann (Straßburg, F), Dan Hultmark (Umeå, S) und Bruno Lemaitre (Gif-sur-Yvette, F) untersucht worden. Die Signalkaskaden werden im Folgenden kurz

schematisch dargestellt (KIMBRELL & BEUTLER 2001, HULTMARK 2003, LECLERC & REICHHART 2004, PILI-FLOURY et al. 2004):

Die Induktion der Transkription bestimmter Immunproteine erfolgt bei Infektion mit Gram-positiven Bakterien und vermutlich auch mit Pilzen über den Toll-Weg. Der Imd-Weg wird durch Zellwandbestandteile von Gram-negativen Bakterien ausgelöst.

Die Aktivierung des **Toll-Signalweges** (siehe auch Abb. A11 im Anhang) resultiert in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Dif. Lys-Peptidoglykan (der meisten Gram-positiven Bakterien siehe Kap. 1.3.1) wird dabei in der Hämolymphe von einem Komplex aus dem löslichen Rezeptor PGRP-SA (siehe unten Kap. 1.3.2) und einem noch nicht näher untersuchten Protein Osiris bzw. einem Protein, das Gram-negative Bakterien bindet, erkannt. Ein Bestandteil der Zellwand von Pilzen assoziiert vermutlich mit dem Protein Hades. In beiden Fällen wird dann eine Proteasekaskade aktiviert – bei Pilzen ist die Serin-Protease Persephone beteiligt – die zur Abspaltung einer Clipdomäne von Spätzle, dem Liganden für den Transmembranrezeptor Toll, führt. Die anschließende Dimerisierung von Toll löst die Bereitstellung eines intrazellulären heterotrimeren Adapterkomplexes aus Myd88, Tube und Pelle aus. Die Interaktion der einzelnen Proteine des Komplexes wird über bestimmte Domänen vermittelt. Toll tritt mit Myd88 über eine Tir-Domäne in Kontakt, die Proteine des Komplexes interagieren miteinander über *death*-Domänen. Myd88 und Pelle nicht treten direkt miteinander in Kontakt. Im nächsten Schritt werden zwei Kaskaden aktiviert. Die Bildung des eben beschriebenen Proteinkomplexes führt zur Aktivierung der Kinase Pelle, die über eine bislang noch unbekannte zwischengeschaltete Kinase das Protein Cactus phosphoryliert. Dadurch wird das Rel-Protein Dif von Cactus, welches degradiert, freigesetzt und kann in den Zellkern eindringen. Erst die zweite Kaskade über eine atypische Proteinkinase C und ein weiteres Protein Ref(2)P, das ebenfalls in den Zellkern eindringt, ermöglicht dann die Expression von Immunproteinen wie Drosomycin.

Der Toll-Weg wurde zuerst und am genauesten in *Drosophila* untersucht. Inzwischen sind zumindest bei *B. mori* ebenfalls entsprechende Gene entdeckt worden, so z. B. ein dem Toll-Rezeptor homologes Gen (IMAMURA & YAMAKAWA 2002). Weitere Nachweise fehlen jedoch noch.



Seit den späten 1990er Jahren wurden entsprechend dem Toll-Rezeptor bei *Drosophila* auch bei Chordaten (*Ciona*, Mammalia) und Cheliceraten (*Tachypleus*) verwandte Rezeptoren (TLR = *Toll like receptors*) gefunden (LOKER et al. 2004, INAMORI et al. 2004). Die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nach TLR- bzw. Toll-Aktivierung in Mammaliern und Insekten weisen gewisse Parallelen auf, einige Faktoren sind echte Homologe (HOFFMANN et al. 1999, MUZIO & MANTOVANI 2000). Ein schematischer Vergleich der beiden Signalwege und ihrer Komponenten findet sich bei KIMBRELL & BEUTLER (2001).

Werden Oberflächenmoleküle von Gram-negativen Bakterien (DAP-Peptidoglykan siehe Kap. 1.3.1) in der Hämolymphe von einem Transmembranrezeptor PGRP-LC (siehe Kap. 1.3.2) unter Umständen zusammen mit einem weiteren Rezeptor, PGRP-LE, auf den Fettkörperzellen gebunden, so wird der **Imd-Weg** aktiviert (siehe auch Abb. A11 im Anhang). Bei diesem Weg wird intrazellulär auf noch unbekannte Weise die Bildung eines Komplexes aus den Proteinen Imd, dFadd und Dredd ausgelöst. Dieser induziert dann wiederum zwei Kaskaden. Die eine aktiviert einen IKK(IkB Kinase)-Komplex aus Ird5, der Kinase dTAK1 80, und Kenny, der akzessorischen Untereinheit. Der Komplex phosphoryliert wiederum Relish. Durch die zweite Kaskade wird über Dredd und/oder über eine weitere noch unbekannte Caspase der inhibitorische Teil (Rel-49) von Relish abgespalten – er verbleibt im Zytoplasma – während der andere Teil, der Transkriptionsfaktor Rel-68, in den Zellkern eindringt und dort die Transkription der Gene für Immunproteine wie beispielsweise Diptericin, Cecropin, Drosocin und Attacin.

Ein weiterer Signalweg, der **JAK/STAT-Weg** (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), wurde zuerst bei Säugern entdeckt. Es stellte sich heraus, dass er bei Insekten nicht nur bei der Individualentwicklung eine Rolle spielt, sondern auch an der zellulären und humoralen Immunantwort beteiligt ist (AGAISSE & PERRIMON 2004). Erste Ergebnisse liegen für *A. gambiae* (BARILLAS-MURY et al. 1999) und *D. melanogaster* (AGAISSE et al. 2003) vor: Bei infizierten Tieren wird der Transkriptionsaktivator STAT vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert. Der JAK/STAT-Weg ist bei *Drosophila* an der Genexpression für ein Protein TEP (*thioester-containing protein*) und für Tot(Turandot)-Proteine beteiligt: Dringen Bakterien in die Hämolymphe ein, so führt dies zur Expression des Upd3-Zytokins in den Hämocyten. Dieses wird dann vermutlich freigesetzt und aktiviert

den JAK/STAT-Signalweg in Fettkörperzellen, der wiederum die Expression von TEPs und Tot bewirkt. TEPs scheinen bei der Phagozytose eine Rolle zu spielen, während die Funktion der Tot-Proteine noch unklar ist. Darüber hinaus wird durch Ablage von Parasitoideneiern ins Wirtshämozyt durch ein noch unbekanntes Signal der sich über die Eier spreitenden Plasmatozyten der JAK/STAT-Weg in den Lymphdrüsen aktiviert. Dies bewirkt dann die Differenzierung von Prohämozyten zu Lamellozyten, die wiederum von den Lymphdrüsen freigesetzt werden Lamellozyten und zur weiteren Einkapselung der Parasitoideneier beitragen (zusammengefasst bei AGAISSE & PERRIMON 2004).

### 1.2.3 Melanisierung und Prophenoloxidasekaskade

Knötchenbildung und Einkapselung sowie die Wundheilung (LAI-FOOK 1966, NAPPI & VASS 1993) werden oft, aber nicht notwendigerweise von einer **Melaninbildung** begleitet. Melanin entsteht nach Aktivierung einer komplexen Enzymkaskade durch Polymerisation von Chinonen. Das Schlüsselenzym ist die Phenoloxidase, die als inaktives Proenzym in der Hämolymphe vorliegt und durch eine aktivierende Enzymkaskade, an der überwiegend Serin-Proteasen beteiligt sind, in die aktive Form überführt wird. Diese Kaskade kann durch Zellwandbestandteile der Hefen ( $\beta$ -1,3-Glukane), Lipopolysaccharide (LPS) aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und durch Bestandteile des Mureinsacculus Gram-positiver Bakterien (Peptidoglukane mit  $\beta$ -1,4-glykosidischer Bindung) stimuliert werden (ASHIDA & YAMAZAKI 1990, SUGUMARAN & KANOST 1993, SÖDERHÄLL & CERENIUS 1998). Zunächst muss ein Prophenoloxidase aktivierendes Enzym in seine aktive Form umgewandelt werden. Dies geschieht über eine Serin-Protease-Kaskade, die zuvor selbst aktiviert wurde, und zwar über einen Komplex bestehend aus den Zellwandbestandteilen und so genannten *pattern recognition proteins* (siehe Kap. 1.3.2), oder anderen endogenen Faktoren, die z. B. bei Zerstörung von Geweben freigesetzt werden. In seiner aktiven Form kann das Prophenoloxidase aktivierende Enzym dann die Prophenoloxidase durch Proteolyse N-terminaler Domänen aktivieren. Die Phenoloxidase wandelt dann Mono- bzw. Diphenole in Chinone um, die zu Melanin polymerisieren (SUGUMARAN & KANOST 1993, CERENIUS & SÖDERHÄLL 2004). Reaktionsschritte der Kaskade, die

durch Serin-Proteasen katalysiert werden, können durch so genannte Serpine, Serin-Protease-Inhibitoren, gehemmt werden.

Bei *M. sexta* wurden inzwischen für die heterodimere Prophenoloxidase zwei Gene – jeweils eins für jede Polypeptid-Untereinheit – identifiziert (HALL et al. 1995, JIANG et al. 1997). Darüber hinaus sind inzwischen drei Prophenoloxidase aktivierende Proteasen bekannt (JIANG et al. 1998, 2001, 2003a und 2003b). Zwei Serin-Protease-Homologe sind offenbar für die Aktivierung der Prophenoloxidase aktivierenden Enzyme notwendig (Yu et al. 2003). Weiterhin wurden drei Serpine gefunden (LI et al. 1999, GAN et al. 2001, Zhu et al. 2003b). Zwei dieser Serpine regulieren nachweislich die Aktivität der Prophenoloxidase (LI et al. 1999, ZHU et al. 2003b).

Melanisierung spielt nicht nur bei den eben erwähnten Prozessen der Immunabwehr eine Rolle, sondern auch bei der Sklerotisierung der Kutikula (CERENIUS & SÖDERHÄLL 2004).

#### **1.2.4 Weitere Faktoren der humoralen Immunantwort**

Weitere Faktoren regulieren und modifizieren durch ihre Wirkung auf Hämocyten indirekt auch die zelluläre Immunantwort. Bei *M. sexta* und *G. mellonella* sind dies beispielsweise Calcium und Zink. Sie verändern die Fähigkeit von Plasmatozyten zur Adhäsion an Oberflächen von Fremdkörpern sowie ihre Interaktionen untereinander (WILLOTT et al. 2002, WILLOTT & TRAN 2002).

Bei *D. melanogaster* löst die Bindung eines *Helix pomatia*-Lektins an Hämomucin die Transkription der Cecropin-Gene aus. Hämomucin ist ein Glykoprotein, das in der Membran von Hämocyten exprimiert und in deren Granulen gespeichert wird (THEOPOLD et al. 1996). Es wird über so genannte Mikropartikel von den Hämocyten freigesetzt und ist an der Koagulation beteiligt (THEOPOLD & SCHMIDT 1997).

### 1.3 Welche Komponenten und Prozesse spielen bei der Auslösung zellulärer bzw. humoraler Immunreaktionen eine Rolle?

Dass es zur Auslösung einer Immunantwort kommt, setzt die Erkennung von „Fremd“ voraus. Insekten besitzen für die Erkennung von Pilzen und Bakterien bzw. deren typischen Oberflächenkomponenten bestimmte Rezeptoren und Erkennungsprotein, die als *pattern recognition proteins* bezeichnet werden.

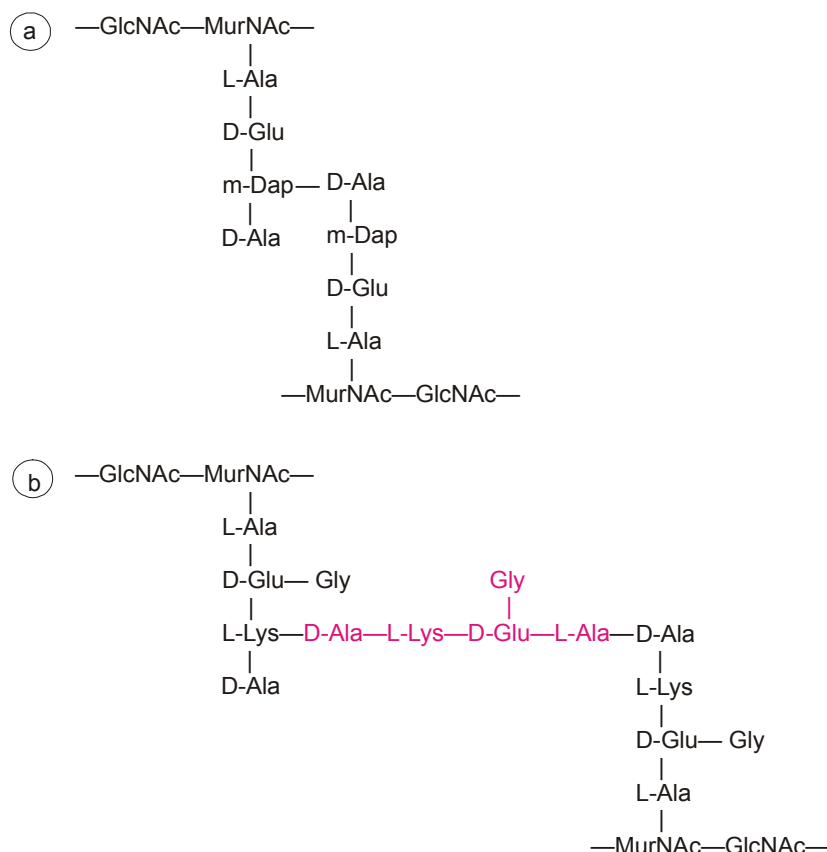
#### 1.3.1 Oberflächenkomponenten von Bakterien und Pilzen, die als PAMPs dienen können

Die Oberflächen von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien bzw. Pilzen unterscheiden sich voneinander. Ihre Komponenten werden auch *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) genannt. Bei Gram-positiven Bakterien sind dies Peptidoglykan und Teichon- bzw. Lipoteichonsäuren, bei Gram-negativen Bakterien v. a. das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Membran, die der dünnen Peptidoglykanschicht aufgelagert ist.

**Peptidoglykan** ist ein Mureinnetz, das aus langen Ketten von  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verbundenen alternierenden Zuckern, *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuramin, besteht. Bei Gram-positiven Bakterien kann dieses Mureinnetz aus 20 bis 70 Schichten, bei Gram-negativen aus ein bis drei Lagen bestehen. Die Polysaccharidketten sind über die an der Lactylgruppe des Muramins gebundenen vier Aminosäuren (L-Alanin, D-Glutaminsäure, *meso*-Diaminopimelinsäure oder L-Lysin, D-Alanin) peptidisch miteinander verknüpft. Bei Gram-negativen und einigen Gram-positiven Bakterien, z. B. *Bacillus*-Arten, kann das Murein *meso*-Diaminopimelinsäure enthalten (DAP-Peptidoglykan). Bei Gram-positiven Bakterien findet man stattdessen meist L-Lysin (Lys-Peptidoglykan, siehe auch Abb. 1). In seltenen Fällen treten noch Ornithin oder Diaminobuttersäure an deren Stelle. Diese Aminosäuren sind für die Ausbildung der intermolekularen Verknüpfung verantwortlich. Bei Gram-negativen Bakterien und *Bacillus*-Arten ist eine direkte Verbindung zwischen der *meso*-Diaminopimelinsäure des einen mit dem endständigen D-Alanin des anderen Tetrapeptids vorhanden (Abb. 1a). Bei anderen Gram-positiven Bakterien wird die Verbindung zwischen L-Lysin und D-Alanin meist über fünf Glycine ausgebildet. Grundsätzlich können aber noch

weitere Modifikationen vorhanden sein, die zur Variabilität des Peptidoglukans beitragen, v. a. in der Pentapeptid-Verbindungsbrücke (Beispiel *M. luteus*, Abb. 1b). So können alle Aminosäuren des Tetrapeptids und weitere, z. B. Threonin, Serin und Asparaginsäure, auch in der Verbindungsbrücke erscheinen (SCHLEGEL 1992, BROCK et al. 1994, GELIUS 2003, DZIARSKI 2004). Teichon- bzw. Lipoteichonsäuren sind dem Peptidoglukan der Gram-positiven Bakterien aufgelagert. Es sind Polymere aus Glycerin- und Ribitmolekülen, die über Phosphatester miteinander verbunden sind.

Gram-negative Bakterien umgibt zusätzlich zum Peptidoglykan eine so genannte äußere Membran, deren äußere Phospholipidschicht Lipopolysaccharid (**LPS**) enthält. LPS ist in den Lipid A-Teil, die Kernzone und die O-spezifischen Seitenketten eingeteilt. Der Lipid A-Teil besteht hauptsächlich aus Fettsäuren und Glucosamin, Kernzone und O-spezifischen Seitenketten aus hochvariablen Polysacchariden (SCHLEGEL 1992, BROCK et al. 1994).



**Abb. 1:** Schematische Struktur von Peptidoglykanfragmenten aus der Zellwand von **a.** *Bacillus megaterium* und *E. coli* mit direkter Quervernetzung der Peptidseitenketten und **b.** *M. luteus* ATCC 4698 mit Quervernetzung über eine (magentafarben markierte) Pentapeptidbrücke (nach SCHLEIFER & KANDLER 1972 und IKETANI et al. 1999)

Bei Pilzen bzw. Hefen sind es die  **$\beta$ -1,3-Glukane** in der Zellwand, die als PAMPs angesehen werden (z. B. OCHIAI et al. 1992).

### 1.3.2 *Pattern recognition proteins bei Insekten*

Die Aktivierung der zellulären Reaktionen und die Induktion der humoralen Immunantwort wird durch mikrobielle Faktoren verursacht. Für die Induktion der Immunproteinsynthese, evtl. aber auch die Aktivierung zellulärer Abwehrprozesse sind deshalb die Erkennung von Bakterien und Pilzen bzw. ihrer Oberflächenkomponenten durch Ligand-Rezeptor-Bindung zu postulieren. Diese Bindefaktoren bzw. Erkennungsproteine können in der Hämolymphe und/oder auf den Zielzellen vorhanden sein. Für ersteren Fall müssen darüber hinaus auch Faktoren angenommen werden, die die entsprechenden Komplexe (Pathogenmolekül und Bindungsfaktor) binden und das Signal weiterleiten können. Inzwischen ist eine Vielzahl von *pattern recognition proteins* (PRPs) bei Insekten und auch beim Menschen bekannt. Einige sollen im Folgenden aufgezählt werden. Grundsätzlich lassen sie sich in drei große Gruppen einteilen: die *peptidoglycan recognition proteins* (PGRPs), LPS-bindende Proteine und  $\beta$ -1,3-Glukan-bindende Proteine.

#### PGRPs

Eines der zuerst identifizierten PGRPs (MW<sub>r</sub> = 19 k) wurde aus der Hämolymphe von Larven des Maulbeerspinners *B. mori* (Lepidoptera) isoliert. Es bindet Peptidoglykan und aktiviert dann die Prophenoloxidasekaskade (YOSHIDA et al. 1996, OCHIAI & ASHIDA 1999).

Von der Taufliege *D. melanogaster* (Diptera) ist inzwischen eine ganze Familie von PGRPs (17 Proteine) bekannt, die sich auf 13 Gene zurückführen lassen (WERNER et al. 2000, WERNER et al. 2003, CHRISTOPHIDES et al. 2002). Sie können sezerniert werden, sind Transmembran- oder intrazelluläre Proteine und kommen in verschiedenen Geweben und Zelltypen vor. PGRPs werden konstitutiv oder nach Induktion exprimiert. Sie werden in sieben lange (PGRP-L) und zehn kurze (PGRP-S) PGRPs entsprechend der Länge ihrer Transkripte (L = long, S = short) eingeteilt. Alle besitzen so genannte PGRP-Domänen. Die kurzen PGRPs weisen ein Signalpeptid und keine Transmembran-Domänen auf. Sie werden vermutlich sezerniert, während die langen PGRPs entweder beides besitzen und deshalb als

Transmembranproteine angesehen werden oder weder eine solche Domäne noch ein Signalpeptid aufweisen und als intrazelluläre Proteine gelten. Für die meisten der *Drosophila*-PGRPs wurde eine Bindung an Peptidoglukan nachgewiesen.

Interessanterweise wurde mit Hilfe von *RNA-mediated interference* (RNAi) in *Drosophila* S2-Zellen nachgewiesen, dass eines der langen PGRPs, PGRP-LC, in die Phagozytose Gram-negativer (!), nicht jedoch Gram-positiver Bakterien involviert und damit am Imd-Weg beteiligt ist (GOTTAR et al. 2002, RÄMET et al. 2002).

*Anopheles gambiae* besitzt sieben Gene für PGRPs (CHRISTOPHIDES et al. 2002). Von diesen kodieren drei für kurze PGRPs und werden aufgrund entsprechender Domänen (siehe oben) als sezernierbare Proteine angesehen. Aus den anderen vier Genen entstehen sechs oder sieben PGRP-L-Formen (DZIARSKI 2004).

Auch in *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) wird ein PGRP mit einem relativen Molekulargewicht von 19 k im Fettkörper und schwächer in Hämocyten bakteriell infizierter Tiere exprimiert (KANG et al. 1998). Es weist wie die *Drosophila*-PGRPs der S-Gruppe ein Signalpeptid auf und wird nach dessen Abspaltung in die Hämolymphe sezerniert. Eine starke Bindung an *M. luteus* sowie eine schwächere an *B. megaterium* wurde nachgewiesen. Eine Bindung an *E. coli* findet hingegen nicht statt.

Darüber hinaus wurden PGRPs bei *Calpodex ethlius* (Lepidoptera) (MARCU & LOCKE 1998) und *Blaberus discoidalis* (WILSON et al. 1999) nachgewiesen.

Auch PGRPs von Säugern wurden identifiziert, beispielsweise von *Rattus norvegicus* (REHMAN et al. 2001), *Mus musculus* (KANG et al. 1998, LIU et al. 2000), *Camelus dromedarius* (KAPPELER et al. 2003) und dem Menschen (KANG et al. 1998, LIU et al. 2001). Dies weist daraufhin, dass es sich bei PGRPs offenbar um in der Evolution konservierte Proteine handelt.

Viele PGRPs weisen neben einer Bindungskapazität an PAMPs auch Amidaseaktivität auf. Einzelne PGRPs aktivieren darüber hinaus die Prophenoloxidasekaskade, den Toll- und den Imd-Signalweg sowie die Phagozytose (zusammengestellt bei DZIARSKI 2004). So wiesen beispielsweise MELLROTH et al. (2003) nach, dass ein *Drosophila*-PGRP, PGRP-SC1B, durch seine Amidaseaktivität Peptidoglukan degradiert. Dabei waren die Unterschiede zwischen dem Abbau des Peptidoglukans von *S. aureus*, *B. megaterium* bzw. *M. luteus* nur

gering. Wurden jedoch die Teichonsäuren von der Oberfläche entfernt, war die enzymatische Aktivität größer. Bei der Lyse des Peptidoglukans wird durch diese Amidaseaktivität die Peptidbindung zwischen der Lactylgruppe des N-Acetylmuramins und den anhängenden Aminosäuren gespalten und nicht wie durch Lysozym die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen den beiden Kohlenhydraten. Das durch die Amidaseaktivität der PGRPs degradierte Peptidoglukan hatte eine wesentlich geringere immunstimulatorische Wirkung auf *Drosophila* mbn-2-Zellen als Peptidoglukan, das durch Lysozymverdau gewonnen worden war. PGRP-SC1B-Mutanten, die keine Amidaseaktivität mehr besaßen, banden trotzdem noch an Peptidoglukan. Die Autoren postulierten daher eine Scavenger-Funktion für PGRP-SC1B.

MORISHIMA et al. (1992) vermuteten, dass zur Auslösung einer Immunantwort mittels Peptidoglukan bei *B. mori* eine Struktur notwendig ist, die aus mindestens vier Zuckern und acht Aminosäuren besteht, IKETANI et al. (1999) postulierten sogar eine minimale Struktur von nur zwei Zuckern und vier Aminosäuren.

Die Funktion Peptidoglukan-Rezeptoren erfüllen beim Menschen auch CD14 (*cluster of differentiation*) und Nod1 und 2 (WEIDEMANN et al. 1997, DZIARSKI 2003). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Peptidoglukan auch an Tubulin (in Makrophagen von Mäusen) bindet. Es verstärkt in Gegenwart von Glyzerin die Polymerisation, in Abwesenheit von Glyzerin wurde diese vermindert, genauso wie durch LPS (DZIARSKI et al. 2000).

### LPS- bzw. Gram-negative Bakterien-bindende Proteine

Verschiedene LPS-bindende Proteine sind bekannt bei *B. mori* (XU et al. 1995, LEE et al. 1996, KOIZUMI et al. 1997), *D. melanogaster* (KIM et al. 2000), *G. mellonella* (KLÜNNER 1994, DUNPHY & HALWANI 1997), *Periplaneta americana* (JOMORI et al. 1990, JOMORI & NATORI 1991, KAWASAKI et al. 1996), *B. discoidalis* (WILSON et al. 1999), *Ceratitis capitata* (MARMARAS & CHARALAMBIDIS 1992, CHARALAMBIDIS et al. 1995), *Hyphantria cunea* (SHIN et al. 2000) und *M. sexta* (YU et al. 1999, YU & KANOST 2000). Es handelt sich bei ihnen beispielsweise um Lektine (bei *P. americana*) oder um Lipophorine (bei *B. mori* und *G. mellonella*). Die LPS-bindenden Proteinen von *M. sexta*, die Immulektine, aktivieren die Prophenoloxidasekaskade (YU & KANOST 2000).



### $\beta$ -1,3-Glukan-bindende Proteine

$\beta$ -1,3-Glukan-bindende Proteine wurden bei *B. mori* (OCHIAI et al. 1992, OCHIAI & ASHIDA 2000), *G. mellonella* (MATHA et al. 1990), *B. discoidalis* (WILSON et al. 1999) und *M. sexta* (MA & KANOST 2000) entdeckt. Weitere  $\beta$ -1,3-Glukan-Erkennungsproteine bzw. ihre Sequenzen wurden im Zuge der Genomprojekte, z. B. bei *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *Plodia interpunctella* identifiziert (zusammengefasst in JIANG et al. 2004).

Darüber hinaus wurden bei verschiedenen Mammaliern Mannose-bindende-Proteine und ein Makrophagen-Mannoserezeptor belegt (FRASER et al. 1998). Auch für den auf Makrophagen befindlichen CD14-Rezeptor wurde eine Bindung von LPS, Peptidoglukan und Lipoteichonsäuren (RIETSCHEL et al. 1998, DZIARSKI et al 2000) sowie eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Peptidoglukan nachgewiesen (GUPTA et al. 1999).

Neben der Identifizierung solcher Bindungsfaktoren wurden auch verschiedene Reaktionen der Hämocyten auf PAMPs wie dem LPS beschrieben. Studien zur Endozytose von LPS zeigten, dass dies bei *B. mori* (XU et al. 1995), *G. mellonella* und dem amerikanischen Seidenspinner, *Hyalophora cecropia* (PREIK-STEINHOFF et al. 1992) ausschließlich durch die Granulären Zellen geschieht. Man kann daher annehmen, dass nur distinkte Zellpopulationen über entsprechende Bindungsmoleküle verfügen.

Bei *M. sexta* sind inzwischen verschiedene **PRPs** entdeckt worden (zusammengefasst in YU et al. 2002):

Zu den PRPs bei *M. sexta* gehören zwei  **$\beta$ -1,3-Glukan-Erkennungsproteine** mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 53 k. Das erste  *$\beta$ -1,3-glucan recognition protein* bindet nicht nur an Hefen bzw.  $\beta$ -1,3-Glukan sondern auch an Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Es wird konstitutiv im Fettkörper exprimiert und in die Hämolymphe sezerniert. Dort ist es an der Aktivierung der Prophenoloxidase beteiligt (MA & KANOST 2000). Das  *$\beta$ -1,3-glucan recognition protein-2* (MW<sub>r</sub> = ca. 52 k) fehlt in der Hämolymphe unbehandelter Larven und wird nach bakterieller Infektion im Fettkörper exprimiert. Es bindet nicht an LPS,

aggregiert jedoch Bakterien und Hefezellen und ist ebenfalls in die Aktivierung der Prophenoloxidase involviert (JIANG et al. 2004).

Wie bereits oben ausgeführt (Kap. 1.2.1) kann auch **Hämolin** (MW<sub>r</sub> = 48 k) als *pattern recognition protein* angesehen werden (YU & KANOST 2002), da es LPS und Lipoteichonsäuren bindet. Nach bakterieller Induktion ist seine Synthese im Fettkörper stark erhöht.

Die vier **Immulektine** von *M. sexta* besitzen ein relatives Molekulargewicht von 35 bis 36 k. Die Immulektine 1 und 2 haben eine starke Affinität für LPS (YU & KANOST 2002). Während Immulektin 1 in der Hämolymphe naiver Larven nicht nachweisbar ist und seine Konzentration nach bakterieller Induktion leicht ansteigt, wird Immulektin 2 konstitutiv exprimiert und erreicht nach einer Infektion die höchste Konzentration aller Immulektine. Immulektin 3 und 4 werden ebenfalls konstitutiv exprimiert; nach bakterieller Infektion erhöht sich ihre Konzentration in der Hämolymphe gar nicht oder nur sehr wenig (YU et al. 2002).

Ein **PGRP** mit einem relativen Molekulargewicht von 19 k wurde auch für *M. sexta* nachgewiesen (YU et al. 2002, ZHU et al. 2003a). Die PGRP-mRNA wird in geringen Mengen im Fettkörper unbehandelter Larven transkribiert. Nach einer bakteriellen Infektion ist die Transkriptionsaktivität jedoch erhöht. Auch in der Hämolymphe werden dann höhere Konzentrationen des PGRP selbst nachgewiesen.

## **1.4        Annexine**

Annexine sind Calcium- und Phospholipidbindende Proteine, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie sind für fast alle Organismengruppen nachgewiesen.

### **1.4.1        Nomenklatur und minimale Charakteristika der Annexine**

Die ersten Annexine wurden in den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt und nach ihren biochemischen Eigenschaften benannt. Sie hießen z. B. Synexin, Lipocortin oder Calpactin. Erst später fand man gewisse Gemeinsamkeiten in der Genstruktur, dem Sequenzmuster und einigen biochemischen Eigenschaften. Man nahm daher einen gemeinsamen evolutiven Ursprung dieser

Multigenfamilie an und schlug 1990 den Namen „Annexine“ (annex = binden) vor. Eine Zusammenstellung der ersten Annexine mit ihren ursprünglichen Namen findet sich bei RAYNAL & POLLARD (1994).

Zwei Kriterien charakterisieren die Mitglieder der Annexin-Familie: Sie müssen Calcium-abhängig negativ geladene Phospholipide binden können und ein konserviertes Strukturelement von etwa 70 Aminosäureresten (aa) enthalten. Dieser so genannte *annexin repeat* (GERKE & MOSS 2002) wird in der vorliegenden Arbeit auch als Annexin-Domäne bezeichnet. Die zweidimensionale Struktur betreffend bilden die Aminosäuren einer Domäne jeweils fünf  $\alpha$ -Helices aus.

Allgemein gelten Annexine als lösliche, hydrophile Proteine, die negativ geladene Membranen Calcium-abhängig binden, wobei die Bindung reversibel ist. Wird Calcium entfernt, z. B. durch Chelatbildner, werden Annexine wieder von der Membran gelöst (GERKE & MOSS 2002).

Nach BARNES & GOMES (2002) exprimieren alle Mammalier-Gewebe Annexine, jedoch nicht alle Annexin-Typen. Eine Ausnahme stellen offenbar die roten Blutkörperchen dar, in denen bisher keine Annexine gefunden wurden. Annexine sind häufig intrazelluläre Proteine, die etwa 0,5 bis 2 % aller zellulären Proteine ausmachen.

Die bis heute am besten untersuchten Annexine sind die der Vertebraten. Sie wurden aber auch bei Invertebraten, Pflanzen, Pilzen sowie bei Protozoen nachgewiesen. Zur Unterscheidung wurden die einzelnen Annexine zunächst mit römischen, später mit arabischen Ziffern versehen, so entspricht etwa Lipocortin 1 Annexin I, Calpactin 1 Annexin II und Synexin Annexin VII bzw. Annexin 7. Da immer mehr Annexine entdeckt werden, wurde 1999 eine Einteilung in verschiedene Familien vorgeschlagen: Die A-Familie (Annexin A1, A2, A3 etc. anstelle von Annexin I, Annexin II, Annexin III etc.) umfasst nun die Annexine der Vertebraten, die B-Familie die der Invertebraten (Insekten, Cnidarier, Nematoden). Annexine von Pilzen und deren nahen Verwandten werden in der C-Familie zusammengefasst, die von Pflanzen in der D-Familie und die der Protisten (hauptsächlich die Gattung *Giardia*) in der E-Familie (BANCES et al. 2000, MORGAN et al. 1999, MOSS & MORGAN 2004). Die Nummerierung der Annexine ist einerseits eher willkürlich. JOHNSTON et al. (1990) nannten die von ihnen neu entdeckten Annexine bei *Drosophila* Annexin IX und X, da diese beiden nicht direkt äquivalent

zu den damals bekannten acht Annexinen von Säugern waren. Andererseits werden zumindest Vertebraten-Annexine entsprechend ihrer humanen Annexin-Orthologe numeriert (GERKE & MOSS 2002). Gute Auflistungen, die allerdings nicht ganz vollständig und aktuell sind – insbesondere die Nicht-Vertebraten-Annexine betreffend –, finden sich auf der Homepage des *European Annexin Project* (<http://www24.brinkster.com/hofmanna/annexins/seq/index.asp>) und bei GERKE & MOSS (2002). Da sich die neue Nomenklatur aber offenbar noch nicht durchgesetzt hat, wird in der vorliegenden Arbeit für ein bestimmtes Annexin immer der Name verwendet, der auch in der Originalliteratur gebraucht wurde, d. h. es tritt z. B. für *D. melanogaster* neben Annexin IX ebenso der Name Annexin B9 auf. Auch in Sequenz-Datenbanken existieren beide Namen und es findet sich nicht immer ein Hinweis auf Synonymie. Außerdem fehlen in der älteren Literatur oft genaue Angaben zur Spezies, bei der ein bestimmtes Annexin untersucht wurde. Es kann aber meistens davon ausgegangen werden, dass es sich dann um ein Annexin der Vertebraten handelt, wenn nicht sogar um ein humanes, da bis in die 90er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein v. a. Annexine des Menschen untersucht wurden und alle Annexine anderer Organismengruppen explizit erwähnt wurden.

#### 1.4.2 Struktur der Annexine

Annexine besitzen vier bzw. acht (siehe unten) so genannte Annexin-Domänen. Darüber hinaus treten bei einigen Untergruppen der Annexine weitere Gemeinsamkeiten auf, z. B. konservierte Teilbereiche, bestimmte variable Regionen oder Erkennungsstellen für alternatives Exon-Spleißen.

Nach ihrer Struktur können die Mitglieder der Annexin-Familie in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die erste umfasst Annexine mit vier Annexin-Domänen und einem relativ kurzen N-Terminus (Annexine I bis V, VIII bis X sowie XII und XIII). Die Annexine der zweiten Gruppe besitzen dagegen einen langen N-Terminus (Annexine VII und XI). Annexin VI bildet allein die dritte Gruppe und ist durch acht Annexin-Domänen charakterisiert (SMITH & MOSS 1994).

Die Forschung beschäftigt sich v. a. mit Vertebraten-Annexinen, hauptsächlich mit denen des Menschen. Diese Annexine besitzen einen konservierten C-terminalen so genannten Kernbereich, während der N-terminale Bereich der Proteine variiert.

Im Kernbereich der befinden sich die Calcium- und Membranbindungsstellen sowie die Annexin-Domänen. Pflanzliche Annexine der D-Familie weisen hingegen keine solche ausgeprägte Variabilität der N-terminalen Region auf (DELMER & POTIKHA 1997).

Für die N-terminalen Regionen einiger Vertebraten-Annexine, Annexin A2, A6, A7 und A13 (<http://www24.brinkster.com/hofmanna/annexins/seq/index.asp>) sowie der Annexine III (human), V (*Rattus*), XI (Bos) und XIV (*Dictyostelium*; zusammengefasst bei MORGAN & FERNÁNDEZ 1997) ist alternatives (Exon-) Spleißen nachgewiesen, insbesondere für diejenigen, bei denen die N-terminale Region besonders lang ist. Auch bei Annexin IX (XIA et al. 2001) und B13 (MATSUNAGA & FUJIWARA 2002) von *B. mori* ist dies der Fall. Bei dem *B. mori*-Annexin IX ist jedoch nicht die N-terminale, sondern die C-terminale Region betroffen. Der Mechanismus des alternativen Exon-Spleißens dient nicht nur bei Annexinen der Transkriptionsregulation (siehe unten).

Der Kernbereich der Annexine mit den Annexin-Domänen hat eine scheibenartige Struktur mit einer leichten Krümmung. Die konvexe Seite enthält die konservierten Calcium-Bindungsstellen. Wenn Annexin mit Phospholipiden einer Membran assoziiert, ist diese Seite zur Membran hin gerichtet. Die leicht konkave Seite zeigt von der Membran weg und ist frei für potentielle zytoplasmatische Bindungspartner (LIEMANN & HUBER 1997, GERKE & MOSS 2002). Im zweidimensionalen durch Röntgenstrukturanalyse bestätigten Modell von Annexin V (Endonexin II) zeigt sich, dass die Aminosäuren so angeordnet sind, dass eine zentrale hydrophile Pore durch die  $\alpha$ -Helices entsteht (LIEMANN & HUBER 1997, Fig. 12 bei ROJAS et al. 1990).

Zumindest für die meisten Vertebraten-Annexine gilt, dass ihre konservierte C-terminale Region die Calcium-abhängige Membranbindung vermittelt, während die variable N-terminale Region offenbar für die unterschiedlichen Funktionen verantwortlich ist, d. h. sie bestimmt den Membrankontakt und die Bindung mit speziellen Liganden (GERKE & MOSS 1997).

### 1.4.3 Vorkommen von Annexinen bei Insekten

Neben den bereits erwähnten Annexinen IX und B13 von *B. mori* und zwei anderen etwas voneinander abweichenden Annexin-Sequenzen (TSUZUKI et al. 2001) finden sich noch weitere Einträge für Insekten-Annexin-Sequenzen in gängigen Datenbanken (z. B. bei Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> [BENSON et al. 2002]). Diese liegen jedoch z. T. nur partiell vor oder sind aus mehreren Expressed Sequence Tags (ESTs) zusammengestellt worden. Es sind dies: Annexin IX von *Armigeres subalbatus*, Annexin IX und X von *Aedes aegypti*, Annexine unbekannter Spezifität von *A. gambiae* und *Apis mellifera* sowie ein dem Annexin B13 ähnliches Annexin von *A. mellifera*. Darüber hinaus sind verschiedene Einträge zu *D. melanogaster*-Annexinen vorhanden (Annexin IX bzw. B9, X und B11), die sowohl von einzelnen Arbeitsgruppen stammen (z. B. Annexin B9 von STOLTZFUS & GROTEWIEL 2000, *direct submission to Genbank*) als auch im Rahmen des *Drosophila*-Genom-Projektes ermittelt wurden.

### 1.4.4 Eigenschaften von Annexinen

Über eine gemeinsame Funktion aller Annexine wird derzeit noch immer spekuliert, obwohl viele Eigenschaften einzelner Annexine bereits bekannt sind. So sprach sich GEISOW (1991) dafür aus, dass sie v. a. eine Rolle bei der Strukturgebung der Zelle spielen, vielleicht bei der Organisation oder der Erhaltung der Doppelmembran-Symmetrie in spezialisierten Epithelien. KOURIE & WOOD (2000) schlugen eine Funktion der Annexine bei der Regulation von Membranfusionen vor.

Die Eigenschaften einiger Annexine sollen im Folgenden beispielhaft aufgeführt werden.

Neben der Bindung phospholipidhaltiger Membranen können Annexine (Annexin A1, A2, A4, A6, A7) auch die Aggregation von Membranvesikeln vermitteln (RAYNAL & POLLARD 1994).

Humanes Annexin A1 verbindet Membranen über eine Bindung der N-terminalen Region mit Proteinen der S100-Familie (MAILLIARD et al. 1996). Es scheint außerdem an der anti-inflammatorischen Immunantwort beteiligt zu sein, was

wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Granulozyten-Bereitstellung, ihrer Wanderung und/oder der Aktivierung von Entzündungen steht (PERRETTI 1998).

An exozytotischen Prozessen sind in Vertebraten neben Annexin A1 beispielsweise die Annexine A2, A3, A6, A7, A11 und A13 beteiligt und in *C. elegans* Annexin B7 (GERKE & MOSS 2002, RAYNAL & POLLARD 1994).

Außerdem scheint humanes Annexin I bei der Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten eine Rolle zu spielen. Es wird vom Zytosol der Zelle auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran exportiert und dient dort neben Phosphatidylserin zur Opsonierung und zur nachfolgenden Beseitigung der apoptotischen Zelle (ARUR et al. 2003). Überdies inhibiert es Phospholipase A<sub>2</sub>, die für inflammatorische Prozesse wichtig ist. Die genauen Funktionen von Annexin A1 finden sich bei PARENTE & SOLITO (2004).

Annexin 2 von *Rattus norvegicus* stellt ein Substrat für viele verschiedene Proteinkinasen dar und ist an der Regulation von Endozytose, Exozytose und Thrombolyse beteiligt (OZEKI et al. 2002). Auch bei bovinem Annexin A2 wird eine durch Proteinkinase C vermittelte Regulation der Calcium-regulierten Exozytose in chromaffinen Zellen beschrieben (SARAFIAN et al. 1991).

Eine Beteiligung an der Dynamik des Membran-Zytoskeletts wurde z. B. für Annexin III beschrieben (RAYNAL & POLLARD 1994).

Bovines Annexin A4 (KAETZEL et al. 2001) sowie humanes Annexin I (RAYNAL & POLLARD 1994) sind Substrate für Proteinkinase C, wobei die Phosphorylierungsreaktion zu Konformationsänderungen des Annexins führt.

Die Bindung von Annexin V an die Membran von Zellen wird als ein Indiz für Apoptose angesehen. Es erkennt und bindet Phosphatidylserin, was zur Hemmung der Koagulation von sterbenden Zellen führt (REUTELINGSPERGER & VAN HEERDE 1997).

Annexin 6 (*Rattus*) ist in Transportvorgänge verwickelt, die zur Degradierung von LDL (*low-density lipoprotein*) führen (PONS et al. 2001).

Für Annexin XII (*Hydra*) sind Proteinkinase C-Erkennungsmotive nachgewiesen (SCHLAEPFER et al. 1992).

Ein weiteres Bindungsmotiv von Annexinen ist die Myristinsäurebindungsstelle. Annexin A13 (aus MDCK-Zellen) weist N-terminal ein solches Motiv auf (FIEDLER et al. 1995). Darüber hinaus wurde zumindest für Isoform A13b eine Lokalisierung

im trans-Golgi-Netzwerk und an der apikalen Zelloberfläche nachgewiesen. Es ist an der exozytotischen Vesikelbildung beteiligt (LAFONT et al. 1998).

Im Allgemeinen gelten Annexine als intrazelluläre Proteine, die im Zytoplasma und/oder intrazellulären Organellen lokalisiert sind und keine Signalsequenzen für den Transport in den Extrazellulärraum aufweisen (GERKE & MOSS 2002). Dennoch sind einige Annexine extrazellulär aufgefunden worden, z. B. Annexin II und V (RAYNAL & POLLARD 1994).

Zusammengefasst kann fest gestellt werden, dass Annexine miteinander aggregieren können, aber auch die Aggregation von Vesikeln bzw. chromaffinen Granulen und die Fusion von Membranen fördern. Es wird daher angenommen, dass sie an der Regulation von Exo- und Endozytose, der Organisation von Membranen, dem Zellwachstum, der Blutgerinnung und der inflammatorischen Immunantwort beteiligt sind (SUDO et al. 1996).

Bis heute sind noch nicht für alle Vertebraten-Annexine Liganden bekannt. Es wird aber zunehmend deutlich, dass es beim Menschen Krankheiten gibt, die mit Mutationen in den Annexin-Genen in Zusammenhang stehen, welche zu Änderungen ihrer Expression, ihrer Eigenschaften oder der Lokalisation führen können. Diese Krankheiten werden Annexinopathien genannt und können die Herzfunktion und den Blutkreislauf betreffen. Auch eine Beteiligung an Autoimmunerkrankungen und an der Entstehung von Krebs wird vermutet (BASTIAN 1997, HAYES & MOSS 2004).

## **1.5 Alternatives Exon-Spleißen**

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass alternatives Spleißen von Genen eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese spielt. So können durch alternatives Spleißen mehr Transkripte von einem einzelnen Gen generiert werden als Gene im gesamten Genom enthalten sind (GRAVELEY 2001). Ein bekanntes Beispiel dafür ist das humane *slo* Gen, das für ein Kanalprotein (*calcium-activated potassium channel* Calcium-aktivierter Kaliumkanal) kodiert, welches an der Schallfrequenzwahrnehmung der einzelnen Haarsinneszellen in der Cochlea des Innenohres beteiligt ist (LODISH 2001).



Eine weiteres Beispiel für alternatives Spleißen betrifft die Induktion der Gentranskription bei der Geschlechtsdifferenzierung von *Drosophila*. Hier ist eine Kaskade von drei Genen betroffen, die jeweils bei Weibchen und Männchen unterschiedlich gespleißt werden und dadurch zur differentiellen Aktivierung der Kaskade führen (LODISH 2001).

Wie zunehmend deutlich wird, zählt das alternative Spleißen von prä-mRNA zu den zentralen Mechanismen der Genregulation in höheren Eukaryoten (BLACK 2003). Man vermutet, dass mehr als die Hälfte der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden, was die Hauptquelle für die Proteinviefalt darstellt (JOHNSON et al. 2003). Gute Übersichten zu unterschiedlichen Spleißmechanismen finden sich bei BLACK (2003) und GRAVELEY (2001). Die durch alternatives Spleißen entstehenden unterschiedlichen Proteine können für die verschiedensten Prozessen benötigt werden, z. B. bei der Entwicklung (Geschlechtsdetermination, Apoptose, Axonleitung) oder bei der Ligandenbindung und enzymatischen Aktivität (BLACK 2003). Fehler, die beim alternativen Spleißen stattfinden, führen zu Krankheiten beim Menschen und wahrscheinlich auch anderen Organismen (COOPER & MATTOX 1997). Die Regulation des alternativen Spleißens erfolgt durch Proteine, die mit der prä-mRNA assoziieren und die Fähigkeit des Spleißosoms zur Erkennung von Spleißstellen verstärken oder reprimieren. Man nimmt an, dass die relative Konzentration von positiven und negativen Spleißregulatoren sowie ihre Interaktion mit der prä-mRNA und Komponenten des Spleißosoms festlegen, ob ein Exon in der reifen mRNA enthalten ist oder nicht (SMITH & VALCÁRCEL 2000). Die Untersuchung solcher Spleißregulatoren wird zur Zeit mit verschiedenen Methoden in Angriff genommen, z. B. die humanen Spleißregulatoren mit *Microarrays* (JOHNSON et al. 2003) oder die von *Drosophila* mit RNAi-Technik (PARK et al. 2004).

## 1.6 Zielsetzung der Promotionsarbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten als Grundlage für weitergehende Studien zunächst zelluläre Erkennungs- und Abwehrprozesse gegen Gram-positive Bakterien bei Larven von *M. sexta* untersucht und deren Ablauf genauer charakterisiert und definiert werden. Weiterführende Versuche konnten dann zielgerichteter angesetzt werden und die Ergebnisse eindeutiger als bisher interpretiert werden. Dazu musste zunächst ein geeigneter Provokator gefunden werden, der eine Immunantwort bei *M. sexta* auslöst.

Für das weitere Vorgehen waren zwei Strategien geplant. Einerseits sollten HämolympHKomponenten, die Gram-positive Bakterien binden bzw. erkennen charakterisiert und gegebenenfalls isoliert werden. Andererseits war geplant, mit molekularbiologischen Methoden potentielle Komponenten der zellulären Abwehr zu ermitteln. Dafür standen zwei cDNA-Expressionsbanken zur Verfügung, die aus Hämocyten bzw. aus dem Fettkörper von mit *E. coli* infizierten *M. sexta*-Larven gewonnen worden waren. Zwei Wege wurden beschritten: Die beiden cDNA-Banken wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen Hämocyten von *M. sexta* bzw. von *D. melanogaster* gescreent. Bei positiven Klonen sollten die möglicherweise interessanten Proteine identifiziert sowie ihre Struktur, ihre theoretischen Eigenschaften und ihr Vorkommen in *M. sexta* näher charakterisiert werden.

Außerdem wurde angestrebt, im Rahmen eines EST-Projekts durch Ansequenzieren zufällig ausgewählter Klone verschiedene Proteine zu bestimmen, die am Immungeschehen beteiligt sein könnten.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden zuerst die verwendeten Materialien aufgezählt und danach die Versuche geschildert, die im Rahmen der Promotion durchgeführt wurden.

### 2.1 Material

Im Folgenden werden zunächst häufig benutzte Geräte und Chemikalien beschrieben sowie die benutzten Computerprogramme genannt. Spezielle Geräte sind bei der Beschreibung einzelner Versuche direkt erwähnt. Zum Schluss werden die verwendeten Organismen und Zelllinien beschrieben.

#### 2.1.1 Geräte

Für Zentrifugationen wurde die kühlbare Hochgeschwindigkeits-Zentrifuge Sorvall Super T 21 (DuPont, Newtown, CT, USA) mit folgenden Rotoren verwendet: ST-H750 (Ausschwingrotor) und SL-50T (Festwinkelrotor). Die Angaben zur Zentrifugationsgeschwindigkeit erfolgen in *relative centrifugal force* (rcf bzw. x g). War eine Kühlung nicht notwendig und war die Probenmenge nicht größer als 2 ml, so wurde eine Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) mit Standardrotor F45-24-11 mit maximal 13.200 rpm bzw. 16.110 x g benutzt. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit wird hier in *revolutions per minute* (rpm) angegeben.

Die Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen wurden im Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie in einem Bereich der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Dort wurden folgende Zentrifugen verwendet: Tischzentrifuge Mikro 20 mit Rotor 2073 (max. Zentrifugationsgeschwindigkeit 13.000 rpm bzw. 16.249 x g) bzw. Mikro 22 R (mit Kühlung) mit Rotor 1015 (max. Zentrifugationsgeschwindigkeit 6.000 rpm bzw. 3412 x g; beide Zentrifugen: Hettich, Tuttlingen).

Für die mikroskopischen Untersuchungen insbesondere die Fluoreszenzmikroskopie stand ein Olympus BX-60 System-Mikroskop (Olympus, Hamburg) mit folgenden Filtermodulen zur Verfügung:

U-M 51004 (Dualbandfilter, sowohl das FITC- als auch das TRITC- bzw. Cy3-Signal werden gleichzeitig sichtbar),

U-MNG (Schmalbandfilter für Rotfluoreszenz, d. h. TRITC und PI),

U-MWIB (Breitbandfilter, sowohl das FITC- als auch das PI-Signal werden gleichzeitig sichtbar),

U-MWIBA (Bandpassfilter geeignet für Mehrfachmarkierungen von FITC und TRITC, bei denen nur das FITC-Signal sichtbar wird)

Darüber hinaus fand folgendes Zubehör Verwendung:

BH2-RFL-T3 Power Supply Unit,

BX-FLA reflected light fluorescence attachment,

BX-UCDB Universal Condensor,

PM 20 Automatic Photomicrographic System.

Die Dokumentation der Beobachtungen erfolgte mit Hilfe einer auf das Mikroskop aufgesetzten Kamera auf Elite Chrome von Kodak bzw. Fujichrome Sensia 400 ASA Diafilmen. Ausgewählte Diapositive wurden mit einer Auflösung von 600 bis 1.200 dpi eingescannt und ebenso wie die nicht-mikroskopischen Aufnahmen beispielsweise von Gelen mit dem Programmpaket CorelDraw (siehe unten) bearbeitet. Es wurden Veränderungen von Kontrast, Helligkeit (immer das Gesamtbild betreffend) und Bildausschnitt vorgenommen.

Alternativ wurde eine Digitalkamera auf dem Mikroskop provisorisch installiert. Dabei wurden mehrere Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts mit verschiedenen Filtermodulen des Mikroskops gemacht (z. B. Modul für Rot- und für Grünfluoreszenz siehe oben). Diese wurden dann mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (siehe unten) übereinander gelegt, so dass beide Fluoreszenz-Signale zu sehen waren. Gegebenenfalls wurden diese Aufnahmen wie oben beschrieben nachbearbeitet.

Das Screening der cDNA-Expressionsbanken (Kap. 2.2.15) sowie die Folgearbeiten bis zur Isolierung der ersten Klone erfolgten im Labor von Prof. Dr. I. Andó, Institute of Genetics, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Ungarn.

Bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit kam folgende Software zum Einsatz: Microsoft Office Paket 2000 (Microsoft® Corporation, USA, 2000), CorelDraw 10.0 (Corel Corporation, Canada, 2000), Adobe Photoshop 3.0 (Adobe Systems Europe Limited, UK, 1996), SigmaPlot 2000 Version 6.0 (Jandel Scientific, USA, 1986-2000), Jandel Application Manager Version 1.0 (Jandel Scientific Software, USA, 1992-1994), GeneDoc 2.6 (NICHOLAS et al. 1997), Chromas Version 2.23 (Technelysium Pty Ltd., AUS, 1998-2002). Bestimmte Programme, insbesondere für Sequenzanalysen, Primer-Design etc. sind bei den einzelnen Methoden speziell erwähnt.

### **2.1.2 Chemikalien und allgemeine Verfahren**

Die überwiegende Zahl der verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Merck-Eurolab bzw. VWR (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Fluka bzw. Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in der Qualität „p. a.“ bzw. „für Analysen“ erworben. Antikörper wurden hauptsächlich von den Firmen Dako Diagnostika (Hamburg), Dianova (Hamburg), Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA) oder Sigma-Aldrich bezogen. Spezielle Feinchemikalien und Kits sind bei den einzelnen Methoden erwähnt.

Sofern notwendig (insbesondere für die Zellkultur- und Bakterienarbeiten) wurden die benutzten Glasgeräte, Produkte und Lösungen bei 121 °C und 202,7 kPa für 20 min mit einem der folgenden Autoklaven sterilisiert: Tischsterilisator Varioklav Typ 250 T (H+P Labortechnik, Oberschleißheim) oder Swiftlock programmable Autoclave (Astell Scientific, Sidcup, Kent, UK). Glasgeräte konnten außerdem bei 160 °C für 3 h in einem Heiz-Brutschrank (Memmert, Schwabach) sterilisiert werden.

Darüber hinaus wurden sterile Einwegartikel verwendet (z. B. Nalge Nunc, Rochester, NY, USA; Greiner Bio-one, Frickenhausen; Sarstedt, Nürnbrecht).

Lösungen wurden mit Wasser – im Folgenden als Milli-Q-H<sub>2</sub>O bezeichnet – aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-QPF Plus Reagent Grade Water Purification

System (Millipore, Bedford, MA, USA) angesetzt, der ein Ionenaustauscher 2800NP (Nowadest, Nistertal) vorgeschaltet war.

War das verwendete Wasser nur einfach deionisiert, d. h. nur über den Ionenaustauscher deionisiert, so wird es im Folgenden Aqua deion. bzw. A. deion. genannt.

Alle erwähnten Firmen und Produktbezeichnungen sind eingetragene Warenzeichen.

### **2.1.3 Der Versuchsorganismus *Manduca sexta***

Als Modell für die der Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen dienten Larven des Amerikanischen Tabakswärmers *Manduca sexta* (LINNÉ).

#### **Taxonomische Einordnung**

*M. sexta* ist ein holometaboles Insekt, das zur Familie der Schwärmer gehört (Systematik nach BROHMER, 1988):

Stamm	Arthropoda
Klasse	Insecta (Hexapoda)
Unterklasse	Pterygota
Ordnung	Lepidoptera
Unterordnung	Glossata
Überfamilie	Sphingoidea
Familie	Sphingidae

Der Lebenszyklus des Tabakswärmers umfasst fünf, in Ausnahmefällen auch sechs Larvenstadien sowie ein Puppenstadium (siehe auch Kap. 2.2.1)

## 2.1.4 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet (Tab. 1):

**Tab. 1:** Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp bzw. Besonderheit	Herkunft	Referenz
<i>Bacillus megaterium</i> V		Labor H. Boman, Karolinska Institute, Stockholm, S	
<i>Escherichia coli</i> K12 D22	Str <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , trp, proA, his, lac, envA, ampA1	Labor H. Boman, Karolinska Institute, Stockholm, S	NORMARK et al. 1969, BEALL & LUTKENHAUS 1987
<i>Escherichia coli</i> K12 D31	Str <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , pro <sup>-</sup> , trp <sup>-</sup> , his <sup>-</sup> , xyl <sup>+</sup> , man <sup>+</sup> , verändertes Lipopolysaccharid	Labor H. Boman, Karolinska Institute, Stockholm, S	MONNER et al. 1971, BOMAN et al. 1974
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-q, recA1, gyrA96, relA1, lac[F' proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	ZAP-cDNA <sup>®</sup> Gigapack <sup>®</sup> III Gold Cloning Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E. coli</i> SOLR	e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC::Tn5 (Kan <sup>r</sup> ), lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1 [F' proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15], Su <sup>-</sup>	ZAP-cDNA <sup>®</sup> Gigapack <sup>®</sup> III Gold Cloning Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698*	lyophilisiert ( <i>M. lysodeikticus</i> )	Sigma-Aldrich	URBAN & SALTON 1983, 1985
<i>Staphylococcus aureus</i> M 152		Stammsammlung, Labor D. Kitzrow, Fachbereich KMUB, FH Gießen-Friedberg, Gießen	KITZROW et al. 1975

### 2.1.5 Antikörper

Für die Immunhistochemie und die Western Blots wurden sowohl polyklonale (Tab. 2) als auch monoklonale primäre Antikörper eingesetzt. Nachfolgend wurden die Präparate sekundären Antikörpern inkubiert. An die sekundären Antikörper (Tab. 3) waren Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme gekoppelt, mit deren Hilfe die Antigen-Antikörper-Bindungen visualisiert werden konnten.

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte standardmäßig mit 0,5 % oder 1 % (w/v) BSA-TBS (zu TBS siehe Kapitel 2.1.6.2).

**Tab. 2:** Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären polyklonalen Antikörper

Antikörper-spezifität	Verdünnung für		Typ	Referenz
	Immunhisto- chemie	Western- Blotting		
Attacin ( <i>Hyalophora cecropia</i> )	1:750	1:10.000	anti-Kaninchen	TRENCZEK & FAYE 1988
Hämolin ( <i>Hyalophora cecropia</i> )	1:750	1:10.000	anti-Kaninchen	Trenczek & Faye 1988
Lysozym ( <i>Hyalophora cecropia</i> )	1:750	1:10.000	anti-Kaninchen	TRENCZEK & FAYE 1988

Die verwendeten monoklonalen Antikörper gegen Hämozyten von *M. sexta* waren von WILLOTT et al. (1994) mittels Fusion mit Hybridomazellen hergestellt worden: X 14 E 07, MS#78 (Subklon von X 14 E 07), MS#77, MS#75, MS#50, MS#30 und Z 18 E 07.

Die für das Screening der cDNA-Expressionsbanken (Kap. 3.4.2) im Western Blot getesteten monoklonalen Antikörper gegen *D. melanogaster*-Hämozyten wurden ebenfalls aus einer Fusion mit Hybridomazellen gewonnen (KURUCZ et al. 2003): 4a2, 4c1 und 16c1.

Es wurden noch weitere monokloale Antikörper verwendet (siehe dazu Kap. 3.4.1 und Kap. 3.4.2), die aber für die vorliegende Arbeit nicht von Bedeutung sind und hier deshalb nicht explizit genannt werden.



**Tab. 3:** Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

Typ	Spezifität	Konjugat	Verdünnung für		Firma & Bestellnr.
			Immunhis- tochemie	Western- Blotting	
anti-Kaninchen	IgG	Alkalische Phosphatase		1:1.000	Dako Diagnostika D-0487
anti-Kaninchen	IgG ( <i>whole molecule</i> )	FITC <sup>a)</sup>	1:150		Sigma-Aldrich F-0382
anti-Maus	IgG ( <i>whole molecule</i> )	Alkalische Phosphatase		1:15.000	Sigma-Aldrich A-3562
anti-Maus	IgG & IgM (H+L)	Alkalische Phosphatase		1:10.000	Dianova 115-055-044
anti-Maus	IgG & IgM (H+L)	Cy3 <sup>b)</sup>	1:800		Dianova 115-165-044
anti-Maus	IgG (H+L)	FITC <sup>a)</sup>	1:128		Dianova 115-095-003
anti-Maus	IgG ( <i>whole molecule</i> )	FITC <sup>a)</sup>	1:200		Sigma-Aldrich F-0257
anti-Maus	IgG ( <i>whole molecule</i> )	HRP <sup>c)</sup>		1:5.000 (in Verbindung mit ECL Kit)	Amersham Pharmacia (Freiburg) NA931
anti-Maus	IgG ( <i>whole molecule</i> )	TRITC <sup>d)</sup>	1:150		Sigma-Aldrich T-5393

<sup>a)</sup> Fluorescein-Isothiocyanat, <sup>b)</sup> Indocarbocyanin 3, <sup>c)</sup> Horse-radish Peroxidase = Meerrettich Peroxidase, <sup>d)</sup> Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat

### 2.1.6 Häufig verwendete Lösungen

In diesem Kapitel werden Lösungen aufgeführt, die entweder häufig verwendet wurden oder Bestandteil anderer Lösungen waren, die in weiteren Kapiteln erwähnt werden. Alle sonstigen Lösungen sind bei der entsprechenden Methode angegeben.

### ***M. sexta*-Salinen**

Zur Gewinnung von Hämozyten und für die Injektionsversuche wurden verschiedene Salinen verwendet:

Die Vollsaline ( $MS^+$ ) sowie die Antikoagulant-Saline (AC-Saline) entsprechen in ihrer Zusammensetzung dem „*Manduca* saline buffer (MSB)“ bzw. der „Anticoagulant saline (AC-saline)“ in WILLOTT et al. (1994). Der pH-Wert wurde davon abweichend bei Vollsaline mit einer 1:1-Mischung von NaOH und KOH auf pH 6,5 eingestellt, bei AC-Saline auf pH 6,0-6,5.

Darüber hinaus wurde Calcium-Magnesium-freie Saline ( $MS^-$ ) verwendet. Sie unterschied sich von Vollsaline nur durch das Fehlen des Calcium- und des Magnesium-Salzes.

Alle Salinen wurden direkt nach der Herstellung sterilfiltriert (Bottle Top Filter mit Membranfiltern, Porendurchmesser 0,2  $\mu m$ , Nalge Nunc) und gegebenenfalls aliquotiert bei etwa 8 °C aufbewahrt.

### **Paraformaldehyd-Fixans**

#### x % (w/v) Paraformaldehyd in $MS^-$

Nach dem vollständigen Lösen des Paraformaldehyds in  $MS^-$  wurde die Lösung filtriert (Faltenfilter 595  $\frac{1}{2}$ , Schleicher und Schuell, Dassel) und aliquotiert.

### **Weitere Lösungen:**

#### **1x Tris Buffered Saline (TBS, pH 7,5)**

(Immun-Blot Assay Kit, Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories, München)

Tris-aminomethan (Tris-Base)	20 mM
NaCl	500 mM

#### **Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,2) (HARLOW & LANE 1988)**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,00 ml

## 2.2 Methoden

Es werden zunächst Methoden zur Stammhaltung und Zucht der verwendeten Organismen und Zelllinien angegeben. Darauf folgt die Erläuterung der Injektion verschiedener Provokatoren in *M. sexta*-Larven, das Arbeitsprotokoll für Phagozytose-Versuche sowie die Beschreibung unterschiedlicher Methoden zum Nachweis der Phagozytose. Dann werden erste Schritte zur Isolierung potentieller Bindungsfaktoren an Gram-positiven Bakterien aufgezeigt. Zum Schluss werden molekularbiologische Methoden zur Isolierung von cDNA aus cDNA-Expressionsbanken geschildert.

### 2.2.1 Zucht von *M. sexta*

Die Larven von *M. sexta* wurden mit einer synthetischen Diät, modifiziert nach YAMAMOTO (1969), aufgezogen.

#### Basisfutter

Weizenkeime	80,0 g
Casein	36,0 g
Saccharose	32,0 g
Hefe	16,0 g
Wesson's Salzmischung	12,0 g
Sorbinsäure	2,0 g
p-Hydroxybenzolsäure-methylester	1,0 g
Cholesterin	3,5 g
Agar-Agar	20,0 g
A. deion.	1.000,0 ml

#### Vitaminlösung

Nikotinsäure	100,0 mg
Riboflavin	50,0 mg
Thiamin	23,0 mg
Folsäure	23,0 mg
Biotin	2,0 mg
A. deion.	ad 100,0 ml

Das Basisfutter wurde im trockenen Zustand vermischt und anschließend in 1.000 ml A. deion. unter ständigem Rühren für 30 min gekocht.

Nach Abkühlen auf 70 °C wurden folgende weitere Substanzen hinzugefügt:

Ascorbinsäure	4,0 g
Leinöl	4,0 g
Formaldehyd 4 % (w/v)	20,0 ml
Vitaminlösung (siehe oben)	10,0 ml

Die Futtermischung wurde aliquotiert und bei 8 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Aufzucht der Larven des Tabakswärmers erfolgte mit artifiziellem Futter in Kunststoffschalen mit perforiertem Deckel in einem Zuchtschrank (Economic Delux, Snijders Scientific, Tilburg, NL). Die Zuchtbedingungen lagen bei 24–25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50–60 % sowie einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h zu 8 h in Anlehnung an YAMAMOTO (1969) und BELL & JOACHIM (1976).

Vom Ei bis zum dritten Larvenstadium (L3) wurden 40 und mehr Eier bzw. nach dem Schlüpfen 10–20 Tiere pro Schale gehalten. Mit zunehmender Größe der Tiere wurde diese Zahl sukzessiv herabgesetzt. So wurden ab dem vierten Larvenstadium (L4) nur noch 2–3 Tiere pro Schale belassen. Kurz vor der Häutung zum fünften Stadium (L5) wurden sie vereinzelt. Damit wurde die Gefahr von Verletzungen durch gegenseitiges Beißen vermieden und die taggenaue Altersbestimmung jedes Individuums ermöglicht (siehe unten). Etwa in der Mitte des fünften Larvenstadiums erfolgte der Eintritt in die so genannte Wanderphase, in der die Larven keine Nahrung mehr aufnehmen, ihr Dorsalgefäß deutlich sichtbar wird und sie eine erhebliche Laufaktivität entwickeln. Sie wurden nun ohne Futter in mit saugfähigem Papier ausgelegte Kunststoffschalen umgesetzt. Die direkt anschließende Vorpuppenphase ist durch ein Einspeicheln der Umgebung, das Einstellen der Bewegung und eine zunehmende Versteifung der Kutikula gekennzeichnet. Wenn die Umwandlung zur Puppe vollständig abgeschlossen war, wurden die Puppen zu mehreren in einem mit Zeitungspapier ausgelegten Kunststoffkasten bei 24–25 °C aufbewahrt. Kurz vor dem Schlupf der Falter wurden die Puppen in Insektenkäfige bei 24–25 °C gelegt, in denen sich

eine Tabakpflanze der Art *Nicotiana tabacum* befand. Sie diente den begatteten weiblichen Tieren für die Eiablage, die zumeist auf der Blattunterseite erfolgte. Dreimal pro Woche wurden die Eier abgesammelt und in den Zuchtschrank verbracht. Die Kunststoffschalen der Larven wurden ebenfalls dreimal pro Woche erneuert und mit frischem Futter versehen.

Da für die Experimente nur Larven einer bestimmten Altersgruppe verwendet werden sollten, wurde die Häutung von L4 zu L5 mehrmals täglich kontrolliert. So beginnt beispielsweise Tag 1 des fünften Larvenstadiums (L5d1) 24 h nach Abschluss der Häutung von L4 zu L5. Für die vorliegende Arbeit wurden hauptsächlich Larven des fünften Stadiums 2–3 Tage nach der letzten Häutung, d. h. L5d2 bzw. L5d3, verwendet. Konnte der Häutungszeitpunkt nicht exakt bestimmt werden, beispielsweise weil er in der Nacht lag, so erfolgte eine ungefähre Altersangabe in Form von z. B. L5d2–3.

## 2.2.2 Kultivierung von Bakterien

Für die Stammhaltung der Bakterien *E. coli* K12 D22 bzw. D31, *B. megaterium*, *M. luteus* und *S. aureus* wurde Standard I-Nährbouillon (Merck-Eurolab) nach Herstelleranweisung mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O angesetzt und mit 1,6 % (w/v) Agar-Agar (hochreine Qualität, Roth) versetzt. Im Folgenden wird der Begriff (Standard I-) Nährmedium verwendet unabhängig davon, ob es sich um Flüssigkulturen oder Agarplatten handelt. Die Mischung wurde in der Mikrowelle (Gerät 8018, Privileg Quelle, Fürth) so lange erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete und dann autoklaviert. Das sterilisierte Nährmedium konnte bei Raumtemperatur aufbewahrt werden und bei Bedarf wieder verflüssigt werden. Nach Abkühlen auf etwa 45–50 °C wurde das Medium unter der Sterilbank (Heraeus-LaminAir ELB 2448, Heraeus, Hanau) in Petrischalen mit Nocken (Durchmesser 94 mm, Höhe 16 mm, MBT, Gießen) gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Agarplatten zur Sterilitätsprüfung über Nacht (ÜN) bei 36–37 °C in einem Brutschrank (Memmert) inkubiert. Sofern nicht sofort eine Beimpfung mit Bakterien erfolgte (siehe unten), wurden die Platten maximal zwei Wochen bei ca. 8 °C gelagert.

Die Pflege und Auffrischung der Stammhaltung wurde alle zwei bis drei Monate durchgeführt. Für Versuche wurden jeweils frische Übernachtskulturen auf den oben beschriebenen Standard I-Agarplatten angelegt. Dazu wurde eine einzelne

Kolonie der Stammpatte mit einer sterilisierten Impföse gepickt und im Dreifelderausstrich auf eine neue Agarplatte übertragen. Die Platten wurden über Nacht bzw. bis zu 24 h bei 36–37 °C inkubiert bis Einzelkolonien sichtbar wurden und danach maximal fünf Tage bei etwa 8 °C zur Entnahme von Einzelkolonien für Versuche gelagert.

Die Stammhaltung der Bakterienstämme *E. coli* XL1-Blue MRF' und *E. coli* SOLR erfolgte nach Anleitung "ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain" (Catalog #200253, Revision #017002, Stratagene). Die Stammkulturen dienten zum Animpfen von Flüssigkulturen z. B. für das Screening von cDNA-Banken.

*E. coli* XL1-Blue MRF' wurde auf LB-Tetracycline-Agarplatten und *E. coli* SOLR auf LB-Kanamycin-Agarplatten bei 37 °C über Nacht kultiviert (Bakterienbrutschrank Typ B 5042E, Heraeus). Anschließend wurden die Platten maximal eine Woche bei 4–8 °C aufbewahrt.

#### **Luria-Bertani(LB)-Agar (pH 7,0) (autoklaviert)**

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Agar-Agar	20 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

#### **Tetracyclin-Stammlösung (steril filtriert)**

Tetracyclin	0,5 % (w/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

#### **LB-Tetracyclin-Agar mit $c_{\text{Tetracyclin}} = 12,5 \mu\text{g/ml}$**

Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  Tetracyclin-Stammlösung zu 100 ml LB-Agar nach dessen Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C.

**Kanamycin-Stammlösung** (steril filtriert)

Kanamycin\* 0,75 % (w/v)

in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

\*als Kanamycin-Monosulfat (Sigma-Aldrich)

**LB-Kanamycin-Agar mit  $c_{\text{Kanamycin}} = 50 \mu\text{g/ml}$** 

Zugabe von 667  $\mu\text{l}$  Kanamycin-Stammlösung zu 100 ml LB-Agar nach dessen Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C.

**Anlegen von Glycerin-Stammkulturen**

Für die Langzeit-Aufbewahrung ausgewählter Klone bei -70 bis -80 °C wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt (siehe auch Protokoll "ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain" Catalog #200253 Revision #017002, Stratagene). Dazu wurden 10 ml des entsprechenden Mediums (für die Klone in *E. coli* SOLR nach der Einzel-Klon Exzision war dies z. B. LB-Ampicillin-Medium, siehe Kap. 2.2.15.4) mit einer Kolonie einer frischen Plattenkultur des gewünschten Klons beimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert (Laborschüttler Certomat R mit Haube Certomat H, B. Braun, Melsungen). Die Bakterien befanden sich am nächsten Morgen in der späten log-Phase. Dann wurden 4,5 ml eines sterilen 1:1-Gemisches aus Glycerin und LB-Ampicillin-Medium mit der Übernachtskultur gut vermischt, in Kryo-Röhrchen (Nalge Nunc) à 1 ml aliquotiert und bei -70 bis -80 °C aufbewahrt (ULT Freezer UF 440-86E, Snijders Scientific).

**2.2.3 Hybridomazellkultur-Arbeiten**

Die Klone der zur Produktion von monoklonalen Antikörpern eingesetzten Hybridomazellen (WILLOTT et al. 1994) wurden in Aliquots bei -70 bis -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Die folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Heraeus-LaminAir ELB 2448, Heraeus) und mit sterilen bzw. sterilisierten Medien und Geräten durchgeführt.

### **Kultur von Hybridomazellklonen**

Sofort nach dem Auftauen der Klone wurden sie in 10 ml auf 37 °C erwärmtes Auftau- und Waschmedium, d. h. RPMI-Medium (siehe unten) mit 10 % (v/v) fetalem Rinderserum (FBS, Gibco, Karlsruhe), überführt und bei 200 x g für 5–7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Waschmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden auf diese Weise noch zweimal gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 1–2 ml auf Raumtemperatur erwärmtem RPMI-Medium mit 10 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) BMH1 (zellspezifische Wachstumsfaktoren, BM-Condimed<sup>®</sup> H1, Boehringer Mannheim, Mannheim) aufgenommen, resuspendiert und in ungleichen Portionen in zwei Näpfe von 4-Loch-Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden) mit je 500 µl Kulturmedium verteilt. Der Zustand der Zellen wurde nach deren Absitzen auf dem Boden der Kulturschalen kontrolliert. Bei einer weiteren Kontrolle nach etwa 4–5 h, wurde die Hälfte bis Dreiviertel des Kulturmediums ausgetauscht.

Die Inkubation der Kulturen erfolgte in einem Brutschrank für Zellkulturen (Begasungsbrutschrank BB16, Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und etwa 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Die Zellkulturen wurden alle 2–3 Tage unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls mit frischem Kulturmedium versorgt. Je nach Zustand und Wachstum der Zellen wurde der Anteil an BMH1 im Kulturmedium von 10 % (v/v) über 5 % (v/v) bis auf 0 % reduziert und dann auch der Anteil an FBS von 10 % (v/v) auf 5 % (v/v) herabgesetzt (Standard-Kulturmedium = RPMI mit 5 % (v/v) FBS). Außerdem wurde das Volumen der Kulturgefäße bis hin zu Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> und mit 20 ml Medium schrittweise erhöht.

Bei der Routinehaltung der Hybridomazellkulturen wurde das Standard-Kulturmedium zwei- bis dreimal pro Woche ausgetauscht. Gleichzeitig wurden tote Zellen durch Schwenken entfernt bzw. die Zahl der wachsenden Hybridomazellen durch Abschlagen vom Flaschenboden reduziert.



### Medium RPMI 1640 für Hybridomazellkulturen

a) als Pulver (Gibco, Karlsruhe)

Das Pulver wurde nach Herstellerangaben in 1.800 ml Milli-Q-H<sub>2</sub>O gelöst.

Zu diesem Ansatz wurden noch hinzugefügt:

HEPES	1,0 M	20 ml
NaHCO <sub>3</sub> (Flüssigmedium, Gibco)	7,5 % (w/v)	20 ml
PEST (Penicillin-Streptomycin 10.000 U, Gibco)	1,0 mg/ml	20 ml
2-Mercaptoethanol	0,1 M	1 ml

Der pH-Wert wurde auf pH 7,1 eingestellt, das Medium mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O auf 1.960 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und in Aliquots zu je 490 ml bei 8–10 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurden pro Aliquot 10 ml 0,1 M Natrium-Pyruvat (steril) zugegeben.

b) als flüssiges Fertigmedium (Sigma-Aldrich)

Zu 500 ml Fertigmedium wurden hinzugefügt:

HEPES	1,0 M	5,00 ml
PEST (Penicillin-Streptomycin 10.000 U, Gibco)	1,0 mg/ml	5,00 ml
2-Mercaptoethanol	0,1 M	0,25 ml
Natrium-Pyruvat	0,1 M	10,0 ml

FBS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Beim Austausch des Kulturmediums wurde der Überstand der Hybridomazellkulturen mit dem darin enthaltenen Antikörpern geerntet. Das 2–3 Tage alte Kulturmedium wurde aus den Kulturflaschen vorsichtig dekantiert bzw. abgesaugt und mit 200 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Natriumazid (Endkonzentration: 0,02 % w/v) versetzt, um beim weiteren nicht-sterilen Arbeiten ein Wachstum von evtl. kontaminierenden Pilzen oder Bakterien zu verhindern.

Die geernteten Überstände wurden auf das Vorhandensein bzw. die "Funktionsfähigkeit" des monoklonalen Antikörpers auf Hämozyten-Monolayern von *M. sexta* getestet (zu Hämozyten-Monolayern siehe Kap. 2.2.8.1).

Mindestens einmal pro Jahr wurden Aliquots von gut wachsenden Kulturen mit guter Antikörperproduktion zur längerfristigen Lagerung als „Backup“ eingefroren: Zunächst wurden die toten Zellen der Kultur entfernt (siehe Kultur von

Hybridomazell-Klonen) und das Kulturmedium erneuert. Danach wurden auch die lebenden Zellen vom Flaschenboden abgeschlagen und zusammen mit dem Kulturüberstand in 15-ml-Röhrchen (Greiner Bio-one) überführt. Diese wurden mit 200–300 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert und für mindestens 30 min zur Reduktion des Zellstoffwechsels auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen je nach Pelletgröße in mindestens 500 µl eiskaltem Einfriermedium bestehend aus RPMI, FBS und DMSO als Gefrierschutz im Verhältnis 5:4:1 resuspendiert. Die Zellen im Einfriermedium wurden nun zu je 500 µl in eisgekühlte Kryoröhrchen (Nalge Nunc) überführt und zunächst für etwa 30–60 min auf Eis gelagert, bevor sie in einer speziellen mit Isopropanol gefüllten und im Kühlschrank vorgekühlten Gefrierdose (Cryo 1 °C Freezing Container, Nalge Nunc) bei –70 bis –80 °C aufbewahrt wurden. Wenn die Zellkultur-Aliquots nach zwei bis drei Tagen durchgefroren waren, konnten sie in Pappboxen bei –70 bis –80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

#### **2.2.4 Gewinnung von Hämozyten und Plasma aus der Hämolymphe von *M. sexta***

Für die Gewinnung von Hämozyten und Hämolymp-Plasma wurden, sofern nicht anders erwähnt, *M. sexta*-Larven des Stadiums L5d2–4 von etwa 5–8 g verwendet.

Die Larven wurden zunächst für etwa 15–20 min bei ca. 8 °C gelagert, um ihre Agilität einzuschränken.

Nachdem das Abdomen der Larven mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfiziert worden war, wurde ein Kranzfüßchen des letzten Abdominalbeinpaares angeschnitten. Die heraustretende Hämolymphe wurde für die Gewinnung der **Hämozyten** in Röhrchen (15-ml-Röhrchen, Greiner Bio-one) mit 4 ml eisgekühlter und mit wenigen Kristallen 1-Phenyl-2-Thiourea (PTU) versetzter AC-Saline aufgefangen und sofort vorsichtig durch Invertieren des Röhrchens vermischt. Die Zellen wurden mit 200 x g für 15 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Hämozyten durch vorsichtiges Resuspendieren in 5 ml eisgekühlter AC-Saline gewaschen und wieder pelletiert. Es folgten zwei weitere Waschschrirte. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem Verwendungszweck der Hämozyten für Monolayer (Kap. 2.2.8.1), zur Herstellung von Hämozytenlysat

für die Elektrophorese (Kap. 2.2.12) oder zur Gewinnung von genomischer DNA (Kap. 2.2.20.1). Waren die Larven mit FITC-markierten Bakterien infiziert worden, so wurden alle Schritte vom Beginn der Hämolymphabnahme an im Halbdunkel durchgeführt.

Sollten **Frischzellpräparate** der Hämozyten angefertigt werden, so wurde die Hämolymphe der Larven in eisgekühlten 1,5-ml-Reaktionsgefäßen (Brand, Wertheim, und Eppendorf-Netheler-Hinz) mit wenigen PTU-Kristallen aufgefangen und mit Grace's Insektenmedium (siehe Kap. 2.2.8.1) 1:2 verdünnt. Ein Tropfen von etwa 50 µl wurde auf einen Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgetragen, sofort mit einem Deckglas bedeckt (Marienfeld, Lauda-Königshofen) und nach 20 min mikroskopisch ausgewertet.

Für die Gewinnung des **Hämolymp-Plasmas** wurde die Hämolymphe direkt in eisgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit wenigen PTU-Kristallen aufgefangen und sofort mit dem Protease-Inhibitor Benzamidin (DEUTSCHER 1990, KOIZUMI et al. 1997) versetzt (Endkonzentration in der Hämolymphe: 1–10 mM). Es folgte zunächst ein Zentrifugationsschritt mit 200 x g für 15 min bei 4 °C, um die Hämozyten vom Plasma zu trennen. Das Plasma wurde vorsichtig in ein neues eiskaltes Reaktionsgefäß mit PTU überführt und mit 1.800 x g bei 4 °C nochmals für 15 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Beim Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde sorgfältig darauf geachtet, keine Koagulationsprodukte mitzuführen. Sofern das Hämolymp-Plasma nicht sofort verwendet wurde, wurde es bei –20 °C aufbewahrt.

#### **Protease-Inhibitor: Benzamidinhydrochlorid (Merck-Eurolab)**

Benzamidinhydrochlorid-Stammlösung

Benzamidinhydrochlorid	100 mM
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

### 2.2.5 Herstellung von Hämozyten- und Fettkörperlysats für die Gelelektrophorese

Für die Anfertigung von Hämozytenlysaten für die Gelelektrophorese wurden die Blutzellen von einzelnen Larven in 4 ml AC-Saline gewonnen (Kap. 2.2.4). Nach dreimaligem Waschen der Hämozyten wurde ihre Konzentration auf  $c = 3 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Portionen von je 30  $\mu$ l wurden aliquotiert und dann vier Zyklen bestehend aus Einfrieren, Auftauen und 4 x 15 s Sonifizieren im Ultraschall-Eis-Wasserbad (Ultraschallbad T310, Elma, Singen) unterzogen. Jede Portion wurde mit 6–7  $\mu$ l 5fach-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert (Heizblock SHT, Stuart Scientific, Redhill, Surrey, UK).

Nach der Gewinnung der Hämozyten wurden die Larven unter TBS so aufpräpariert, dass der Fettkörper entnommen werden konnte. Er wurde mehrfach in TBS gespült und dann in 200  $\mu$ l TBS mit 20  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) überführt und mechanisch homogenisiert. Die Probe wurde portioniert und wie bei der Anfertigung des Hämozytenlysats vier Zyklen aus Einfrieren und Ultraschallbehandlung unterzogen. Danach wurden die Portionen mit 10.000 x g für 10 min bei 4 °C von Zellfragmenten befreit. Der Überstand wurde noch weitere zweimal mit 10.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und 30  $\mu$ l-Portionen aliquotiert, die wie oben beschrieben mit Probenpuffer versetzt und denaturiert wurden.

### 2.2.6 Injektionsversuche

Um Unterschiede zwischen naiven und immunkompetenten Larven zu ermitteln sowie für Untersuchungen zur Phagozytose von Bakterien, wurden *M. sexta*-Larven mit verschiedenen abgetöteten Bakterienstämmen bzw. mit Bestandteilen der Zellwand Gram-positiver Bakterien infiziert. Für bestimmte Versuche wurden *M. luteus*- und *B. megaterium*-Zellen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert und injiziert.

Es wurden in der Regel L5d2-4-Larven mit einem Gewicht von etwa 5 g und mehr verwendet (HURLBERT et al. 1985). Sie wurden individuell nummeriert und etwa 15 min bei 8 °C gelagert, um ihre Agilität herabzusetzen. Es erfolgte eine Oberflächendesinfektion mit 70 % (v/v) Ethanol im hinteren Drittel der Larven. Die Injektionslösung (siehe Kap. 2.2.6.1.1–2.2.6.1.2) wurde langsam lateral im

hinteren Bereich möglichst flach unter die Kutikula kopfwärts injiziert. Bevor die Kanüle wieder aus dem Tier entfernt wurde, wurde etwa 3–5 s gewartet. Dies sollte das Austreten der Injektionslösung durch die Einstichstelle vermindern. Die Larven wurden dann in saubere Zuchtschalen mit frischem Futter gesetzt. Es erwies sich als günstig, die Tiere mit dem Kopf auf dem Futterstück zu plazieren, da sie meist sofort mit dem Fressen begannen und sich weniger häufig mit ihrer Injektionswunde befassten oder am Futter entlangkrochen und es dadurch zu keiner Sekundärinfektion der Wunde durch Hefen aus dem Futter kommen konnte. Nach in der Regel 24 bzw. 48 h Inkubation (siehe Kap. 2.2.1) wurde die Hämolymphe der infizierten Tiere entnommen (siehe Kap. 2.2.4). Als Kontrollen dienten Larven, denen sterile Vollsaline injiziert worden war (Kontrolle des Wundeffektes), und völlig unbehandelte (ub) Larven gleichen Alters und gleicher Hälterungsbedingungen.

#### **2.2.6.1 Herstellung der Injektionssuspensionen**

Für die Injektionsversuche wurden ganze Bakterien sowie Bestandteile der bakteriellen Zellwand verschiedener Größe und Qualität eingesetzt.

##### **2.2.6.1.1 Herstellung von Bakteriensuspensionen zur Injektion**

Zur Injektion wurden folgende Bakterienstämme verwendet: *B. megaterium*, *E. coli* K12 D22, *M. luteus* (gefriergetrocknet) und *S. aureus*. Alle Bakterienstämme (Ausnahme gefriergetrockneter *M. luteus*) mussten zunächst herangezogen und danach abgetötet werden.

Dazu wurde von jedem Stamm eine 10-ml-Übernachtskultur (12–16 h) in Standard I-Nährbouillon angesetzt (Inkubationsbedingungen: 36 °C, schüttelnd auf Unimax 1010 mit Inkubator 1000, Heidolph, Kelheim). Am nächsten Morgen wurden 15–20 ml frisches Nährmedium mit 200 µl der Übernachtskultur beimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer Optischen Dichte (OD) von 1,0–1,2 inkubiert (gemessen bei  $\lambda = 546 \text{ nm}$  (OD<sub>546</sub>) mit UV-Spektrometer Helios  $\gamma$ , Unicam, Cambridge, UK). Dann wurden die Kulturen mit 1.800 x g für 20 min bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen.

Zunächst wurden verschiedene Abtötungsmethoden getestet:

**Abtöten mit UV-Licht**

Das Pellet wurde in 10 ml PBS (pH 7,2) oder in Vollsaline resuspendiert und in einer sterilen Petrischale (offen) auf Eis unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus-LaminAir ELB 2448, Heraeus) platziert. Die Bakterien wurden etwa 60 min mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm bestrahlt (Hand-UV-Lampe in ca. 20-30 cm Abstand zur Petrischale zusätzlich zu der in der Sicherheitswerkbank installierten UV-Lampe).

**Abtöten mit 4 bzw. 6 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösung**

Das Bakterienpellet wurde in 10 ml der Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert und 2 h bei 8–10 °C geschüttelt.

Die potentiell abgetöteten Kulturen wurden danach abzentrifugiert (siehe oben) und dreimal mit steriler Vollsaline gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml Vollsaline aufgenommen und ein Kontrollausstrich auf Standard-I-Nährmedium (Agarplatten) angefertigt. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Bakterien als Provokator wurden nur abgetötete Bakterien injiziert, da ein unkontrolliertes bakterielles Wachstum in der Insektenlarve vermieden werden sollte.

Es stellte sich heraus, dass nur die Abtötung mit 4 bzw. 6%igem Paraformaldehyd erfolgreich war, so dass nur noch diese Methode verwendet wurde.

Die Konzentration der Bakterien suspension (Bakterienstammlösung) wurde mit einer Neubauer-*improved* Zählkammer (Marienfeld) bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die Suspension bei –20 °C aufbewahrt.

Die gewünschte Injektionskonzentration wurde durch Verdünnen der Bakterienstammlösung mit steriler Vollsaline hergestellt.

Die Injektionskonzentration und das -volumen war für einzelne Versuche unterschiedlich. Die Standard-Injektionskonzentration für *B. megaterium* lag bei  $c = 2 \times 10^9$  Bakterienzellen/ml Vollsaline bei einem Injektionsvolumen von 50 µl bzw. 100 µl pro L5 Larve.

Die Injektionskonzentrationen für *S. aureus* lagen zwischen  $c = 10^5$  Bakterienzellen/ml Vollsaline und  $c = 10^{10}$  Bakterienzellen/ml Vollsaline bei einem Injektionsvolumen von 100 µl.

*E. coli* K12 D22 wurde in einer Konzentration von  $c = 10^9$  Bakterienzellen/ml Vollsaline mit einem Volumen von 100  $\mu$ l injiziert.

Gefriergetrockneter *M. luteus* konnte für die Stammlösung ( $c = 1$  mg *M. luteus* / ml Vollsaline) direkt eingewogen werden. Diese wurde 1:5 mit steriler Vollsaline verdünnt (Endkonzentration:  $c = 0,2$  mg/ml). Davon wurden 50  $\mu$ l pro L5-Larve injiziert. Dies entspricht etwa einer Konzentration von  $c = 4 - 8 \times 10^8$  Bakterienzellen/ml Vollsaline.

#### **2.2.6.1.2 Herstellung von Suspensionen verschiedener Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien zur Injektion**

Die Gewinnung der Zellwand von *M. luteus* erfolgte in Anlehnung an ARAKI et al. (1972): 10 g gefriergetrockneter *M. luteus* wurden in 70–80 ml Milli-Q-H<sub>2</sub>O resuspendiert und 10-ml-Portionen aliquotiert. Zu jedem Aliquot wurden 6 g Glasperlen (Durchmesser ca. 100  $\mu$ m, MBT) gegeben, die zuvor mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt worden waren. Die Zellen wurden mit einem Sonifizierstab (Branson-Sonifier Modell B-12 Ultraschall-Desintegrator, Gerhard Heinemann Laborgeräte, Schwäbisch Gmünd) 7 min mit 20 kHz auf Eis aufgebrochen. Um die Glasperlen wieder zu entfernen, wurde die Suspension gefiltert (Rundfilter LS 14, Porendurchmesser 70 mm, Schleicher & Schuell). Der Filter wurde mehrfach mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O gespült, um letzte Reste des Bakterienmaterials zurückzugewinnen. Alle Filterdurchläufe wurden vereinigt und zweimal für 10 min mit 2.200 x g bei 10 °C zentrifugiert. Dadurch wurden größere noch zusammenhängende Zellbestandteile aus dem Überstand der Suspension entfernt.

Der Überstand wurde zweimal für 45 min mit 20.000 x g bei 10 °C zentrifugiert. Im Pellet befanden sich nun die Zellwände, im Überstand kleine Cytoplasma-Proteine. Die Pellets dieser beiden Zentrifugationsschritte wurden zusammen in 50 ml kalter 1 M NaCl-Lösung resuspendiert und mit 18.000 x g für 45 min bei 10 °C pelletiert. Bei dieser Fraktion handelt es sich nach ARAKI et al. (1972) um den "rohen Zellwand-Extrakt". Der Zellwand-Extrakt wurde dann in 40–50 ml Milli-Q-H<sub>2</sub>O resuspendiert und zur Deaktivierung lytischer Enzyme für 20 min auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension mit 25 ml 2 M Natrium-Acetat-Puffer pH 5,9 gemischt und mit 1,67 mg Ribonuklease für 3 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein einstündiger Zentrifugationsschritt mit 20.000 x g. Das Pellet wurde in 16,7 ml 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5 resuspendiert und

für 2 h mit 2 mg Trypsin bei 37 °C verdaut. Das Pellet nach einem Zentrifugationsschritt mit 20.000 x g für 45 min wurde mit 20 ml 0,4 % (w/v) SDS-Lösung versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O wurde das Zellwandmaterial lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. So wurden aus 10 g gefriergetrocknetem *M. luteus* ca. 0,16–0,20 g lyophilisiertes Zellwandmaterial gewonnen.

Für die Peptidoglukan-Präparation wurde etwa 0,1 g des lyophilisierten Zellwandmaterials in ca. 20 ml 0,1 N HCl resuspendiert und 24 h unter Schwenken auf 60 °C erhitzt. Nach einer einstündigen Zentrifugation mit 20.000 x g wurde das Präzipitat („größere“ Peptidoglukan-Fragmente) viermal mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O gewaschen (20.000 x g, 45–60 min, 10 °C) und lyophilisiert.

Für den Lysozym-Verdau wurden 33 mg des Lyophilisats mit 1,65 mg Hühnereiweiß-Lysozym (Merck-Eurolab) in 0,2 M Ammonium-Acetat-Puffer pH 6,0 resuspendiert und mit 2 ml 10 % (w/v) Natriumazid zu einem Endvolumen von 40 ml versetzt. Die Suspension wurde bei 37 °C unter Schwenken so lange inkubiert, bis der Verdau abgeschlossen war (keine weitere Veränderung der OD). Die fotometrische Bestimmung erfolgte bei  $\lambda = 490$  nm gegen Ammonium-Acetat-Puffer. Die nun entstandenen „kleineren“ Peptidoglukan-Fragmente wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Injektionsversuche musste das für den Verdau verwendete Hühnereiweiß-Lysozym (14 kDa) jedoch mittels Zentrifugation über Cut-off-Filter (Centrisart I Zentrifugaleinheiten, Sartorius, Göttingen; Zentrifugation nach Herstellerangaben) wieder entfernt werden. Dabei wurde zunächst ein 20-kDa-Filter verwendet. Das entstandene Ultrafiltrat wurde auf etwa die Hälfte eingeeengt (Evaporator Zentrifuge Univapo 100 H, Uniequip Laborgerätebau & Vertriebs GmbH, Martinsried) und nochmals über einen 10-kDa-Filter zentrifugiert. Die nun vorhandenen („kleineren“) Peptidoglukan-Fragmente hatten demnach eine molekulare Masse von < 10 kDa und lagen in gelartiger Konsistenz vor.

Für die Injektion des Zellwandmaterials bzw. der Peptidoglukan-Fragmente wurden verschiedene Verdünnungen in steriler Vollsaline angelegt (Tab. 4). Das Injektionsvolumen pro Tier betrug 50 µl bzw. 100 µl.



Injektionsmaterial	Konzentration
lyophilisiertes Zellwandmaterial	c = 10 µg/50 µl bzw. c = 0,2 mg/ml <sup>1)</sup>
„kleinere“ Peptidoglykan-Fragmente < 10.000 Da	c = 0,5 mg/50 µl bzw. c = 10 mg/ml und c = 0,05 mg/50 µl bzw. c = 1 mg/ml

#### 2.2.6.1.3 FITC-Markierung von Bakterien für Injektionsversuche

### Natriumborat-Puffer (pH 9,0)

Borsäure	20 mM
NaCl	150 mM
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

### 2.2.6.2 Injektion verschiedener Provokatoren in *M. sexta*

Für die Injektion wurden die *M. sexta*-Larven (je 5 Tiere für jeden Provokator) vorbereitet (siehe Kap. 2.2.6). Die auf die gewünschte Konzentration eingestellte Injektionssuspension wurde kräftig durchmischt (Mini-Schüttler MS1, IKA, Wilmington, NC, USA) und sofort in die vorbereiteten 5 Tiere injiziert (Einmal-Feindosierungs-Spritzen Omnifix-F 1 ml, Kanülen Sterican Gr. 20 [ø 0,40 x 20 mm, 27 G x 3/4"], beide B. Braun). Dabei wurde einer zügigen Injektion der Vorzug gegenüber einem Kanülenwechsel bei jedem Tier gegeben, damit die Bakteriensuspension in der Spritze noch gleichmäßig resuspendiert war und so die Injektionsdosis für jedes Tier möglichst einheitlich war. Als Kontrollen dienten sowohl Larven, denen sterile Vollsaline injiziert worden war (Kontrolle des Wundeffektes) als auch unbehandelte (ub) Larven. Alle Larven wurden bis zur Hämolymphabnahme unter den gleichen Bedingungen wie die Zuchttiere gehalten. Die Inkubationsdauer betrug sofern nicht anders erwähnt 24 h.

### 2.2.7 Bestimmung von antibakterieller bzw. lytischer Aktivität (Hemmhoftests)

Zur Auswertung der Injektionsversuche (Kap. 2.2.6) wurden verschiedene Methoden benutzt. So wurde die Hämolymphe zunächst im Hemmhoftest auf das Vorhandensein antimikrobieller bzw. lytischer Aktivität untersucht.

Die **antibakterielle Aktivität gegen *E. coli*** wurde im Hemmhoftest gegen den Stamm *E. coli* K12 D31 bestimmt. Der Test wurde nach FAYE & WYATT (1980) mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Das Medium (1 g Oxoid Agar No. 1 [Oxoid, Wesel] und 2,5 g Standard I-Nährbouillon gelöst in 100 ml A. deion.) wurde nach dem Abkühlen auf 47 °C mit 100 µl einer Kultur in der logarithmischen Phase ( $OD_{546} = 0,5-0,51$ ) des oben genannten *E. coli*-Stammes beimpft, gut vermischt und zu je 7 ml in Petrischalen mit Nocken (Durchmesser 94 mm, Höhe 16 mm, MBT) ausgegossen (Endkonzentration ca.  $0,5-1,0 \times 10^5$  Bakterien/ml Agar). Die ausgestanzten Löcher hatten einen Durchmesser von 3 mm und wurden mit 3 µl Probe, d. h. mit unverdünnter Hämolymphe der Versuchslarven, bzw. Referenzlösung beschickt. Als Referenzen (Standard-Reihe) zur Ermittlung einer Regressionskurve dienten 11 Gentamycin-Lösungen (Serva) mit Konzentrationen von 1–100 µg Gentamycin/ml Milli-Q-H<sub>2</sub>O (1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg,

20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg/ml). Auf jeder Platte mit Proben wurden zwei Löcher mit Referenz-Lösungen (mit  $c = 10 \mu\text{g/ml}$  und  $c = 60 \mu\text{g/ml}$ ) beschickt, die bei der Auswertung zunächst mit der Regressionskurve aus der Standardreihe verglichen wurden. War die Abweichung zu groß, wurde die Platte verworfen. Die *E. coli*-Platten wurden insgesamt 72 h inkubiert. Nach 24 h wurde der Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe dokumentiert und nach 48 h und 72 h auf das Verschwinden der Hemmhöfe hin kontrolliert. Das Verschwinden der Hemmhöfe bzw. die wiederkehrende Eintrübung der Hemmhofregion durch einsetzendes bakterielles Wachstum wurde als bakteriostatische Aktivität der Probe gewertet. Blieb der Hemmhof jedoch auch 72 h nach dem Einwirken der Probe klar, so wurde dies als bakterizide Aktivität gewertet.

Die **bakteriolytische Aktivität** in den Hämolympheproben wurde im Hemmhoftest (Agar-Lochplattentest) gegen gefriergetrockneten *M. luteus* gemessen. Abweichend von den Vorschriften nach MOHRIG & MESSNER (1968) wurden 350 mg *M. luteus* in 10 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,4–6,5 vorgelöst und zu 60 ml des auf ca. 60 °C abgekühlten Puffers gegeben. In diesen 60 ml Puffer waren zuvor 700 mg Agar No. 1 (Oxoid) unter Erwärmen gelöst worden (Endkonzentration der Bakterien  $c = 5 \text{ mg Bakterien/ml Puffer}$ ; Endkonzentration des Agars im Puffer  $c = 1 \% \text{ w/v}$ ). Das Volumen der Suspension pro Petrischale sowie der Durchmesser der ausgestanzten Löcher und die Probenmenge (unverdünnte Hämolymphe der Versuchslarven) pro Loch entsprachen den Angaben des Hemmhoftests für die Messung der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* K12 D31. Hühnereiweiß-Lysozym (HEL, Merck-Eurolab) in Milli-Q-H<sub>2</sub>O wurde in 17 verschiedenen Konzentrationen als Vergleichsstandard verwendet ( $1,0 \times 10^5 \mu\text{g}$ ,  $7,5 \times 10^4 \mu\text{g}$ ,  $5,0 \times 10^4 \mu\text{g}$ ,  $2,5 \times 10^4 \mu\text{g}$ ,  $1,0 \times 10^4 \mu\text{g}$ ,  $7,5 \times 10^3 \mu\text{g}$ ,  $5,0 \times 10^3 \mu\text{g}$ ,  $2,5 \times 10^3 \mu\text{g}$ ,  $1,0 \times 10^3 \mu\text{g}$ ,  $7,5 \times 10^2 \mu\text{g}$ ,  $5,0 \times 10^2 \mu\text{g}$ ,  $2,5 \times 10^2 \mu\text{g}$ ,  $1,0 \times 10^2 \mu\text{g}$ , 75 µg, 50 µg, 25 µg, 10 µg/ml). Auch hier wurden auf jede Platte neben den Proben zwei Referenzlösungen (mit  $c = 1,0 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$  und  $c = 1,0 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ ) aufgetragen. Die Platten wurden in der Regel 24 h bis zur Auswertung, d. h. bis zur Bestimmung des Hemmhofdurchmessers, inkubiert. Bei beiden Hemmhoftests wurde den Proben bzw. Referenz-Lösungen ca. 30 min Zeit gegeben, in den Agar hineinzudiffundieren, bevor die Platten *up-side-down* bei 36–37 °C inkubiert wurden. Zum Ausmessen der Hemmhöfe stand eine Schublehre mit einer Ablesegenauigkeit von 0,1 mm zur Verfügung.

Zur Auswertung der beiden Tests wurde eine Regressionskurve über die jeweiligen Standardwerte erstellt, anhand derer die entsprechenden Werte als Gentamycin-Aktivitäts- bzw. als Lysozym-Äquivalente bestimmt werden konnten. Der Regressionskoeffizient sollte dabei nicht unter 0,95 liegen. In die Rohdatentabelle wurde der Wert „Null“ aufgenommen, wenn kein Lysehof entstanden war, da nicht entschieden werden konnte, ob die Aktivität unter der Nachweisgrenze lag oder nicht vorhanden war.

## **2.2.8 Immunhistochemie**

In diesem Kapitel wird das Auftreten zell- und gewebespezifischer Proteine bzw. charakteristischer Oligosaccharide bei *M. sexta* beschrieben. Sie wurden mit Antikörpern *in situ* markiert und mit Fluoreszenz visualisiert.

### **2.2.8.1 Herstellung von Hämozyten-Monolayern**

Nach dem Waschen der Hämozyten (siehe Kap. 2.2.4) wurde das Zellpellet je nach Größe in 0,5 bis 1,5 ml Grace's Insektenmedium pH 6,5 (Serva) mit 0,035 % (w/v)  $\text{NaHCO}_3$  (Herstellung nach Packungsanweisung) aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Je ein Tropfen (10–20  $\mu\text{l}$ ) der Zellsuspension wurde in eine Vertiefung eines 10- bzw. 12-Loch-Objektträgers (ICN, Aurora, OH, USA) in pipettiert. Es sollten sich möglichst viele Hämozyten in einem Loch befinden, die sich jedoch nicht überlagern, sondern einzeln gut voneinander separiert vorliegen sollten. Dies wurde nach der Beschickung der ersten Vertiefung mikroskopisch kontrolliert und das Volumen für die weiteren Löcher gegebenenfalls korrigiert. Alle folgenden Schritte fanden nun in der feuchten Kammer und – falls nicht anders erwähnt – bei Raumtemperatur statt, um ein Eintrocknen der Zellsuspension zu verhindern. Die Hämozyten setzten sich im Verlauf von 10 min ab und wurden mit je einem Tropfen 3,5 % (w/v) Paraformaldehyd in  $\text{MS}^-$  pro Loch für 10 min fixiert. Die Hämozyten wurden zweimal kurz mit TBS gewaschen. War die Permeabilisierung der Hämozytenmembran erwünscht, folgte nun ein Inkubationsschritt von 5 min mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in 3% (w/v) BSA-TBS. Die Triton-Lösung wurde mit TBS abgespült und die Hämozyten-Monolayer wurden für 30 min mit 3 % (w/v) BSA-TBS blockiert. Wurden die Präparate nicht

sofort verwendet, so wurde das BSA-TBS abgesaugt und die Objektträger wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei Bedarf wurden sie unter TBS bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wieder aufgetaut. Nach dem Auftauen bzw. nach der Blockierung erfolgte die Inkubation der Hämocyten mit primärem Antikörper (10  $\mu\text{l}$  pro Loch) über Nacht bei  $10^{\circ}\text{C}$ . Danach wurden sie viermal für jeweils 15 min mit TBS gewaschen und mit sekundärem Antikörper (10  $\mu\text{l}$  pro Loch) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Waren die sekundären Antikörper FITC- oder TRITC-konjugiert, wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt. Die Hämocyten wurden nach der Inkubation wieder viermal für jeweils 15 min mit TBS gewaschen und mit DABCO-Glycerin eingedeckelt. Die Objektträger lassen sich mehrere Jahre im Dunkeln bei  $8^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

Stammten die Hämocyten-Monolayer von Larven, denen FITC-markierte Bakterien infiziert worden waren, so wurden alle Arbeitsschritte im Halbdunkel durchgeführt.

### **DABCO-Glycerin**

DABCO (1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane)	2,5 g
Glycerin	90,0 ml
Tris-Base 50 mM pH 7,6	10,0 ml

### **2.2.8.2 Präparation von Geweben und Organen (*Whole-mount-Präparate*)**

Für die Präparation ganzer Gewebe wurden Larven der Stadien L4 (die Kopfkapsel schiebend zu L5: L4\* bzw. L4\*\*) und L5d0–1 verwendet, die z. T. mit *B. megaterium* bzw. gefriergetrocknetem *M. luteus* infiziert worden waren. Sie wurden 24 h nach der Infektion (p. i.) präpariert. Nach 15 min Vorkühlung der Larven bei  $8^{\circ}\text{C}$  wurde ihnen ca. 1 ml 6 % (w/v) Paraformaldehyd in  $\text{MS}^-$  im hinteren Drittel so lange kopfwärts injiziert, bis der Enddarm aus dem Tier heraustrat und auch das Fixans aus allen Körperöffnungen wieder hinausfloss. Die mit Fixans vollgepumpten Larven fixierten nun bei  $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$  für 1–3 h. Danach wurden sie der Länge nach aufpräpariert und mit TBS benetzt. Teile des Fettkörpers sowie ein Stück des Mitteldarms Teil des Integuments von etwa 1 cm Kantenlänge im hinteren Drittel der Larve wurden herauspräpariert. Bei den

infizierten Tieren schloss letzteres die Injektionsstelle mit ein. Alle folgenden Schritte wurden nun in 6-Loch-Kultur-Platten und, sofern es sich um Gewebe von mit FITC-markierten Bakterien infizierten Larven handelte, im Halbdunkel durchgeführt. Jede Gewebeprobe wurde mehrfach mit 6 % (w/v) Sucrose-TBS gespült, wobei der Darm der Länge nach aufgeschnitten wurde. Es folgte nun eine Blockierung mit 3 % (w/v) BSA-TBS für 2 h bei Raumtemperatur. Gegebenenfalls ging der Blockierung eine Vorinkubation mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in 3 % (w/v) BSA-TBS für 20 min voraus (siehe auch Kap. 2.2.8.1). Danach wurde viermal kurz mit TBS gewaschen und über Nacht unter Schwenken (Rotationsschüttler Rotamax 120, Heidolph) bei 10 °C mit primärem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Präparat vor der Inkubation mit sekundärem Antikörper (1–2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken) viermal für jeweils 15 min mit TBS gewaschen. Nach weiteren vier Waschschritten mit TBS à 15 min erfolgte das Eindeckeln des Fettkörpers mit DABCO, des Darms und des Integuments in Aquatex (Merck-Eurolab). Nach dem Erstarren des Einbettungsmittels wurden die Präparate mikroskopisch ausgewertet. Als Kontrollen dienten Präparate, die entweder ohne Antikörper oder nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert worden waren.

### **2.2.8.3      Anfertigung von Ganztierschnitten (Histologie)**

L4-Larven mittleren Alters (L4d3-4) wurde 1-2 ml Fixans (6 % w/v Paraformaldehyd in MS<sup>-</sup>) injiziert. Nach 30 min erfolgte unter Fixans die Abtrennung des Kopfes und eines kleinen Stücks des Abdomens. Der Hauptteil der Larve wurde für die weitere Fixierung in geeignete Gefäße überführt. Die Fixierung erfolgte über Nacht mit einmaligem Wechsel des Fixans. Innerhalb der nächsten 24 h wurde insgesamt viermal mit TBS gewaschen. Das Präparat wurde dann in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % (v/v) Ethanol in TBS jeweils 2x 1 h unter Schwenken).

Für die Einbettung in Paraffin wurde das Präparat zunächst für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur in 100 % Isopropanol überführt (mit einmaligem Austausch des Alkohols) und danach für 1 h bei 56–58 °C gelagert. Alle weiteren Einbettungsschritte fanden nun bei dieser erhöhten Temperatur statt. Das Präparat wurde in einem Gemisch aus 100 % Isopropanol und Paraffin (Verhältnis 1:1) für ca. 12 h bzw. über Nacht gelagert. Nach zwei weiteren Inkubations-

schritten von jeweils 3–4 h in reinem Paraffin wurden die Präparate ausgegossen und nach dem Erstarren des Paraffins bei Raumtemperatur aufgeblickt. Jeweils 7 µm dicke Schnitte wurden auf mit Gelatine-Chromalaun beschichteten Objektträgern aufgefangen (0,5 % w/v Gelatine und 0,2 % w/v Chromalaun in A. deion.).

Es folgte nun die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden sie für zweimal 10 min in Rotihistol (Roth) überführt, für zweimal 5 min in einem Gemisch aus Rotihistol und 100 % Ethanol (Verhältnis 1:1) inkubiert und zum Schluss über eine absteigende Ethanol-Reihe (96 %, 90 %, 80 %, 70 % v/v Ethanol in A. deion.) für jeweils 5 min entparaffiniert. Nach dem letzten Ethanol-Schritt wurden sie luftgetrocknet.

Vor der Behandlung mit dem primären Antikörper (siehe Kap. 2.2.8.1 bzw. 2.2.8.2) wurden die Schnitte mit TBS befeuchtet.

## **2.2.9 Versuche zur Phagozytose von Bakterien**

Untersuchungen zur Phagozytose von (FITC-markierten) Bakterien durch Hämozyten von *M. sexta* wurden sowohl *in vitro* (auf Objektträgern) als auch *in vivo* (Injektion der Bakterien direkt in die Larve) durchgeführt.

### **2.2.9.1 Phagozytose-Assay mit Hämozyten von *M. sexta***

Der Phagozytose-Assay wurde in Anlehnung an SILVA et al. (2002) durchgeführt: Die wie in Kapitel 2.2.4 beschriebenen vorbereiteten L5d2-4-Larven von *M. sexta* wurden durch Abtrennen eines Kranzfüßchens in eiskaltes Grace's Insektenmedium (siehe Kap. 2.2.8.1) entblutet, so dass Hämolymphe im Verhältnis 1:10 zum Grace's Insektenmedium (mit wenigen Kristallen PTU) vorlag. Hämolymphe und Grace's Medium wurden durch Invertieren des Röhrchens gemischt. Je 100 µl der Hämozyten-Suspension wurden auf vorbereitete, d. h. mit 70 % (v/v) Ethanol gesäuberte, runde Deckgläschen (Durchmesser 10 mm, Marienfeld), die einzeln in 24-Loch-Platten platziert worden waren, getropft. Nach 30 min zum Absetzen der Hämozyten wurden weitere 100 µl Grace's Insektenmedium zum Waschen der Zellen zugegeben und die gesamte Flüssigkeitsmenge gleich wieder abgesaugt. Es wurden nun auf jedes Deckgläschen je 200 µl Grace's Insektenmedium und 5 µl einer Suspension FITC-markierter Hefen ( $c = 1,5 \times 10^8$  Hefezellen/ml) gegeben

(Kontrolle: ohne Hefesuspension). Die Inkubationszeit betrug 3 h bei 25 °C im Dunkeln. Danach wurden die Hämocyten-Monolayer fünfmal kurz mit AC-Saline gewaschen und 10-20 min mit 3,5 % (w/v) Paraformaldehyd in MS<sup>-</sup> fixiert. Nach drei Waschschritten mit TBS wurden sie für 30 min mit 3 % (w/v) BSA-TBS blockiert. Es folgte eine ÜN-Inkubation mit 200 µl eines primären Antikörpers (z. B. MS#78) bei 10 °C unter langsamem Schwenken (Rotationsschüttler Rotamax 120, Heidolph). Am nächsten Tag wurde zunächst fünfmal kurz mit TBS gewaschen, 20 min mit TBS inkubiert und nochmals fünfmal gewaschen. Dann folgte eine einstündige Inkubation mit sekundärem Antikörper (siehe Kap. 2.1.5, hier Cy3-markiert zur Unterscheidung von FITC-markierten Hefen, 100 µl Antikörper pro Deckglas) bei Raumtemperatur im Dunkeln (Kontrolle: TBS statt sekundärem Antikörper). Danach wurde zunächst fünfmal kurz mit TBS gewaschen, einige Minuten in 200 µl TBS inkubiert, weitere dreimal mit TBS sowie zweimal mit A. deion. Gewaschen, bevor jedes Deckglas mit einem Tropfen Mowiol (Calbiochem, Schwalbach/Ts.) auf einem Objektträger eingedeckelt wurde. Das Einbettungsmittel wurde leicht modifiziert nach den Herstellerangaben angefertigt:

#### **Mowiol (Calbiochem)**

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerin	6,0 g
A. deion.	6,0 ml

Die Lösung wurde über Nacht gut gemischt (Rotationsschüttler). Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl

Es wurde wiederum gut gemischt bis zum vollständigen Lösen des Mowiols. Zum Schluss wurde die Lösung über einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gegeben und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.9.2 Phagozytose-Versuche *in vivo***

Um den Verbleib der Bakterien in der Hämolymphe von *M. sexta* nach der Injektion zu verfolgen, wurden FITC-markierte *M. luteus* (Injektionsdosis 50 µl mit  $c = 1,16 \times 10^8$  Zellen/ml oder 20 µl bzw. 30 µl mit  $c = 5,8 \times 10^8$  Zellen/ml) und *B. megaterium* (Injektionsdosis 100 µl mit  $c = 10^9$  Zellen/ml) in L4d1–3 bzw. L5d2–4-Larven von *M. sexta* injiziert. Als Kontrolle diente die Injektion FITC-markierter



*E. coli* ( $c = 1,2 \times 10^8$  Bakterien/ml; Stamm 0111:B4 Aceton-behandelt, Sigma-Aldrich; Bakterien wurden von T. Trenczek zur Verfügung gestellt), deren Phagozytose durch Hämocyten bei *G. mellonella* nachgewiesen ist (FOTIADOU, 1994). Die Larven wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten nach der Injektion (p. i.) präpariert (0,5; 1; 3; 5; 15 bzw. 24 h). Nachdem zunächst die Hämolymphe der Tiere gewonnen und ein Frischzellpräparat angelegt wurde, wurden Fettkörper und Malpighische Gefäße in sowie ein Stück des Integuments (etwa  $1 \text{ cm}^2$ ) um die Injektionsstelle herum entnommen und auf die markierten Bakterien hin unter dem Mikroskop untersucht. Das Integument wurde kurz in 5 % (w/v) Sucrose-TBS gespült und von der Innenseite her betrachtet. Für die Hämocyten-Frischzellpräparate wurde Hämolymphe 1:2 mit Grace's Insektenmedium (siehe Kap. 2.2.8.1) vermischt. Ein Tropfen der Mischung wurde auf einen Objektträger gegeben, gegebenenfalls wurde ein Quenching-Reagenz hinzugefügt (siehe Kap. 2.2.9.3). Nach 20 min (zum Absetzen der Hämocyten) konnten sie mikroskopisch untersucht werden.

### 2.2.9.3 Quenching

Zum Nachweis, ob die FITC-markierten injizierten *B. megaterium*-Zellen auch wirklich von den Hämocyten phagozytiert worden waren und nicht nur an die Hämocyten angelagert waren, wurde mittels Trypanblau (HED 1986) bzw. Propidiumjodid das Leuchten der freien nicht phagozytierten Bakterienzellen überlagert. Nur lebende Hämocyten im Frischzellpräparat können Propidiumjodid wieder ausscheiden, phagozytierte Bakterienzellen sollten also noch eine starke Fluoreszenz zeigen, während nicht aufgenommene Bakterien nicht mehr oder nur noch schwach leuchten sollten.

Trypanblau wurde als 0,2 %ige (ROHLOFF et al. 1994), 1 %ige und 5 %ige (w/v) Lösung in  $\text{MS}^-$  getestet, Propidiumjodid (PI) als 1 %ige (w/v) Lösung in  $\text{MS}^-$ , wobei für 25  $\mu\text{l}$  Hämolymphe-Grace-Gemisch (siehe Kap. 2.2.9.2) 2,5  $\mu\text{l}$  der PI-Lösung verwendet wurden.

### 2.2.10 Untersuchung von Hämozyten mittels Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM)

Ein weiteres Verfahren, um zu überprüfen, ob Hämozyten von *M. sexta* auch tatsächlich Bakterien aufgenommen hatten, war ihre Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop. Dazu wurden L5d3 Larven von *M. sexta* mit *B. megaterium* infiziert (Kontrollen: unbehandelte Larven; Kap. 2.2.6) und die Hämozyten nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten gewonnen (Kap. 2.2.4). Dabei wurde jede Larve separat in 4 ml eiskalte AC-Saline entblutet, die 2,0 % (v/v) Glutaraldehyd und 0,8 % (w/v) Paraformaldehyd enthielt (modifiziert nach STETTLER et al. 1998). Auch die folgenden Waschschriffe wurden mit dieser AC-Saline mit Fixanzien durchgeführt. Die gewaschenen Hämozytenpellets zweier gleichartig behandelter Larven wurden vereinigt und bei 8–10 °C in Fixativ (MS<sup>−</sup> mit 2,0 % v/v Glutaraldehyd und 0,8 % w/v Paraformaldehyd) für 2 h leicht schüttelnd inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe à 20 min in Sucrose-TBS ( $C_{\text{Sucrose}} = 50 \text{ g/l TBS}$ ). Zur zweistündigen Postfixierung bei Raumtemperatur diente 2 % (w/v) Osmiumtetroxid in TBS. Die Einbettung erfolgte in LR White-Harz (Plano, Wetzlar). Dazu wurden die Hämozyten zunächst je zweimal 20 min mit Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen überschichtet (aufsteigende Konzentrationsreihe: 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % (v/v) Ethanol in TBS) und dann für 1 h in einer Mischung aus LR White-Harz und 96 %igem (v/v) Ethanol im Verhältnis 1:1 in geschlossenem Gefäß bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präparat wurde zunächst für 1 h im offenen Gefäß in reinem LR White Harz im Eisbad inkubiert und anschließend über Nacht in frischem LR White Harz nachbehandelt. Zum Schluss wurden die Hämozyten 48–50 h bei max. 50 °C in geschlossenen Gelatine kapseln eingebettet. Sie können so bei Raumtemperatur über Jahre hinweg aufbewahrt werden.

Für die mikroskopische Untersuchung wurden zunächst Semidünnschnitte von ca. 1 µm Dicke angefertigt (Ultramikrotom OMU 3, Reichert-Jung, Wien, A), die mit 0,1 %iger (w/v) Toluidinblau-Lösung angefärbt wurden. Sie wurden mit dem Lichtmikroskop dahingehend untersucht, ob eine geeignete Schnittebene für die Ultradünnschnitte getroffen war. Die Ultradünnschnitte (ca. 60–70 nm) wurden auf mit Formvar 1595 E (c = 0,3 % w/v, Serva) beschichtete Kupfernetzchen aufgebracht und mit 1 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung für 20 min sowie 0,35 %iger (w/v) Bleicitrat-Lösung nachkontrastiert (modifiziert nach REYNOLDS

1963). Die Auswertung geschah am Transmissionselektronenmikroskop (EM 9 A, Carl Zeiss, Oberkochen) und wurde fotografisch auf Planfilmen (70 mm x 70 mm, Agfa-Gevaert, Mortsel, B) festgehalten.

#### **0,1 %ige (w/v) Toluidinblau-Lösung**

Toluidinblau O	0,1 g
Borax (di-Natrium-tetra-borat)	0,1 g
A. deion.	100,0 ml

#### **0,3 % (w/v) Formvar 1595 E**

Formvar (Polyvinylformal)	0,3 g
Chloroform	100,0 ml

#### **1 %ige (w/v) Uranylacetat-Lösung**

Uranylacetat	0,1 g
A. deion.	10,0 ml

#### **0,35 %ige (w/v) Bleicitrat-Lösung**

Bleicitrat	35,0 mg
10 N NaOH	500,0 µl
A. deion.	9,5 ml

### **2.2.11 Affinitätspräzipitation (Bakterienbindungs-Assay)**

Als Affinitätsmatrix für die Präzipitation eines potentiellen Peptidoglukan bindenden Faktors aus der Hämolymphe von *M. sexta* wurden zwei verschiedene Gram-positive Bakterien verwendet. Während der Versuche stellte sich heraus (Kap. 2.2.11.2), dass eines der Bakterien, *M. luteus*, ungeeignet war. Die Matrix resp. das Bakterium wurde lysiert. Es wurde zunächst versucht die Lyse zu unterbinden (Kap. 2.2.11.3), später wurde als Matrix nur noch das zweite gegen Lysozym unempfindlichere Bakterium, *B. megaterium*, verwendet.

### 2.2.11.1 Durchführung der Affinitätspräzipitation

Der Versuch diente dazu, mittels Affinitätspräzipitation Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien in der zellfreien Hämolymphe von *M. sexta* nachzuweisen und zu isolieren.

Der Versuch wurde in Anlehnung an LEE et al. (1996), SUN et al. (1990), KANG et al. (1998), KOIZUMI et al. (1997) und YOSHIDA et al. (1996) durchgeführt:

Als Affinitätsmatrix wurden zunächst gefriergetrockneter *M. luteus* sowie *E. coli* K12 D31 als Positiv-Kontrolle und mit Paraformaldehyd abgetöteter *B. megaterium* verwendet. Nachfolgend wird nur das Verfahren mit *B. megaterium* als Matrix beschrieben (siehe oben).

Die Gewinnung des unverdünnten zellfreien Hämolymp-Plasmas erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wobei direkt nach dem Entbluten der Larven (L5d3–4) der Protease-Inhibitor Benzamidinhydrochlorid (0,1 M Stammlösung in Milli-Q-H<sub>2</sub>O) zur Hämolymphe zugegeben wurde (Endkonzentration in der Hämolymphe 1–10 mM nach KOIZUMI et al. 1997 und DEUTSCHER 1990). Das Plasma von etwa sieben unbehandelten Larven L5d2–3 wurde zusammengeführt.

Die Bakterien wurden mit 4 %igem (w/v) Paraformaldehyd abgetötet (Kap. 2.2.6.1.1). Pro Ansatz wurden  $3,23 \times 10^{10}$  *B. megaterium* in 1 ml MS<sup>+</sup> eingesetzt.

Folgende Ansätze wurden hergestellt: Die Bakterien wurden pelletiert (3.500 x g, 20 min) und direkt in 3 ml Hämolympplasma mit PTU resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Als Negativ-Kontrollen wurden die Bakterien in MS<sup>+</sup> inkubiert. Es wurde nochmals der Protease-Inhibitor Benzamidinhydrochlorid (siehe oben) zugesetzt.

Danach erfolgte die Rückgewinnung der Bakterien durch Zentrifugation mit 3.500 x g für 20 min bei 4 °C und dreimaligem Waschen mit MS<sup>+</sup> zur Entfernung ungebundener Hämolympbestandteile.

Die Desorption potentieller an die Bakterien gebundener Hämolympbestandteile erfolgte mittels zweier unterschiedlicher Methoden:

- a) durch Erhöhung der Salzkonzentration mittels NaCl
- b) mittels pH-Shift

a) Zu jeder Probe wurde 1 ml einer 0,5–1 M NaCl-Lösung gegeben; die Probe wurde dann 30 min bei 8–10 °C schüttelnd inkubiert. Im folgenden Zentrifugationsschritt (3.500 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien von den nun desorbierten Hämolympbestandteilen im Überstand getrennt. Die Bakterien

wurden mit MS<sup>+</sup> mehrfach gewaschen und für spätere Analysen bei -20 °C gelagert.

Aufgrund des hohen Salzgehaltes in den Probenüberständen mit den potentiellen Bindungsproteinen aus der Hämolymphe wurden diese zunächst auf etwa 200–250 µl eingeengt und dann gegen 1 l 20 mM Tris-Base (pH 6,7) für 20 h bei zweimaligem Austausch des Puffers dialysiert (Dialysemembran Zellu Trans, Roth, Vorbereitung der Membran nach Herstellerangaben). Zum Schluss wurden die Proben nochmals auf 125 µl eingeengt. Ihre Analyse geschah mittels Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Detektion der Proteine durch Silberfärbung (siehe unten).

b) Als weitere Methode zur Desorption der potentiell an die Bakterien gebundenen Hämolympheproteine wurde eine starke Erniedrigung des pH-Wertes in den Proben angewendet (pH-Shift). Dazu wurden die Bakterien zunächst mit 1,5 ml 0,5 M NaCl-Lösung gewaschen (3.500 x g, 10 min, 4 °C). Dann wurde jede Probe mit 1 ml 100 mM Na-Acetat-Puffer mit 0,5 M NaCl (pH 4,0) für 15 min unter Schütteln bei 8–10 °C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (3.500 x g, 15 min, 4 °C) und der Überstand wurde mit 1 M Tris-Base neutralisiert. Ein geeignetes Mischungsverhältnis war im Vorversuch bestimmt worden (ca. 75–80 µl Tris-Base pro 1000 µl Puffer). Das Bakterienpellet wurde nun einmal mit 1 ml MS<sup>+</sup> gewaschen und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

Die Desorption durch eine Erhöhung der Salzkonzentration (a) erwies sich als ungeeignet. Es wurde nur noch mittels pH-Shift desorbiert.

Die neutralisierten Überstände (ca. 1 ml) wurden auf etwa ein Drittel (300 µl) ihres Volumens eingeengt und gegen 3 l TBS für etwa 18–20 h bei 8–10 °C dialysiert. Die dialysierten Proben wurden nochmals auf 400–800 µl konzentriert bzw. so lange eingeengt, bis ein Präzipitat entstand, das in möglichst wenig Milli-Q-H<sub>2</sub>O wieder gelöst wurde.

Die Proben wurden im Vergleich zu Überständen einzelner Waschschriffe sowie zum Bakterienpellet und der nach der Inkubation mit der Bakterien-Matrix rückgewonnenen Hämolymphe auf einer SDS-PAGE (12% Trenngel) analysiert.

Um die Lyse von *M. luteus* durch das Lysozym der Hämolymphe zu hemmen, wurden außerdem Versuche mit dem Hemmstoff Histamindihydrochlorid

durchgeführt (siehe Kap. 2.2.11.3), d. h. zusätzlich zu den Proben von Hämolymphe bzw. Saline und Bakterien wurden noch solche mit Zusatz von 0,8 M Histamindihydrochlorid eingesetzt.

### Acetat-Puffer pH 4,0

Lösung A:

Natrium-Acetat            100 mM  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

Lösung B:

Essigsäure 100%            100 mM  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

Mischungsverhältnis für pH 4:

Lösung A                    36 ml

Lösung B                    164 ml

### 2.2.11.2 *In-vitro*-Versuche zur Lyse von *M. luteus*

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass sich die Matrix aus *M. luteus* bei der Affinitätspräzipitation auflöste bzw. die Bakterien relativ schnell aus der Hämolymphe von *M. sexta* verschwanden (Phagozytose-Versuche), wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies v. a. am konstitutiv in der Hämolymphe vorhandenen Lysozym liegt. Dazu wurden weitere *in-vitro*-Untersuchungen durchgeführt:

Zunächst wurde im Hemmhoftest mit *M. luteus* (bakteriolytische Aktivität gegen *M. luteus*, siehe Kap. 2.2.7) die durchschnittliche Lysozymaktivität von naiven *M. sexta*-Larven (L5) bestimmt (n=20).

Da sich in Vorversuchen herausstellte, dass die tatsächlichen Verhältnisse im Tier (Bakterienkonzentration wie Injektionsdosis, Hämolymphe naiver *M. sexta*-L5-Larven) aus technischen Gründen *in vitro* nicht exakt simuliert werden konnten, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden in jedes Loch 250 µl einer Lösung bestehend aus 50 µl Hühnereiweiß-Lysozym(HEL)-Lösung ( $c_{\text{HEL}} = 2,5 \text{ mg/ml}$ ) und 200 µl *M. luteus*-Suspension mit Konzentrationen zwischen  $c = 2,5 \text{ mg/ml}$  und  $c = 0,25 \text{ mg/ml}$  pipettiert. Dies entsprach für HEL einer Endkonzentration von  $c = 0,5 \text{ mg/ml}$  und für *M. luteus* Endkonzentrationen von 0,2 mg, 0,4 mg, 0,6 mg, 0,8 mg, 1,0 mg, 1,2 mg bzw. 2,0 mg/ml pro Loch. Es wurden jeweils vier Parallelreaktionen durchgeführt. Als Kontrollen dienten reine *M. luteus*-Sus-

pensionen mit den Endkonzentrationen von  $c = 0,2 \text{ mg/ml}$  und  $c = 2,0 \text{ mg/ml}$  sowie reine HEL-Lösung mit der Endkonzentration von  $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ .

Zuerst wurden die verschiedenen *M. luteus*-Suspensionen vorgelegt. Sofort nach Zugabe der HEL-Lösung begann die Messung der OD bei  $\lambda = 419 \text{ nm}$  (Microplate Reader Model 550 mit Microplate Manager/PC Data Analysis Version 3.1, Bio-Rad) zunächst im Minutenabstand, später in zeitlich größeren Abständen. Dabei war das Gerät so eingestellt, dass die Mikrotiterplatte vor jeder Messung 9 s lang geschüttelt wurde, um eine homogene Mischung zu gewährleisten.

### **2.2.11.3 Hemmung des Lysozymverdaus mit Imidazol bzw. Histamindihydrochlorid**

Der Verdaus von *M. luteus* durch das Lysozym in der Hämolymphe von *M. sexta* während der Affinitätspräzipitation sollte gehemmt werden. Dazu wurden in Vorversuchen geeignete Konzentrationen zweier als Hemmstoffe agierender Substanzen ermittelt:

Die Hemmung des Verdaus von *M. luteus* durch Lysozym wurde variiert nach SHINITZKY et al. (1966) durchgeführt: Als Hemmstoffe wurden  $0,4 \text{ M}$  Imidazol in PBS sowie  $0,08 \text{ M}$  und  $0,24 \text{ M}$  Histamindihydrochlorid in  $0,1 \text{ M}$  Ammonium-Acetat-Puffer getestet. Die Untersuchung wurde im Mikrotiterplatten-Maßstab mit einem Volumen von  $250 \text{ }\mu\text{l}$  pro Loch und sechs Parallelansätzen pro Probe durchgeführt sowie jeweils drei parallele Kontrollreaktionen. Als Negativ-Kontrollen dienten *M. luteus* resuspendiert in PBS bzw. in Ammonium-Acetat-Puffer sowie Imidazol-PBS und Histamin in Ammonium-Acetat-Puffer ohne Zugabe von *M. luteus*. Als Positiv-Kontrolle wurde *M. luteus* resuspendiert in PBS unter Zugabe der HEL-Lösung verwendet. Die Bestimmung der OD erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 419 \text{ nm}$  zunächst jede Minute innerhalb der ersten 6 bis 10 min und danach in größeren Zeitabschnitten. Jeder Messung ging ein 9 s langer Vibrationsintervall der Mikrotiterplatte voraus. In einem Vorversuch war ermittelt worden, dass der stärkste Verdaus innerhalb der ersten 5 min stattfand. Bei diesem Vorversuch betrug die Endkonzentration der *M. luteus*-Suspension pro Loch  $c = 300 \text{ }\mu\text{g/ml}$ , die der HEL-Lösung  $c = 15 \text{ }\mu\text{g/ml}$ .

Als geeignete Konzentrationen von Histamindihydrochlorid und Imidazol ermittelt worden waren, wurde der Versuch statt mit Hühnereiweißlysozym mit Hämolymphe unbehandelter *M. sexta*-Larven durchgeführt.

Die Rohdaten aller Messungen befinden sich auf einer CD-ROM, die in der AG Prof. Dr. T. Trenczek, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, hinterlegt ist.

### **2.2.12 Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Zum Vergleich zwischen naiven und infizierten Larven von *M. sexta* wurden neben den Hämozytenproteinen auch Proteine des Hämolymp-Plasmas untersucht. Dies geschah mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Dazu wurde eine Mini Protean II Elektrophorese-Apparatur mit Power Pac 1000 (Bio-Rad) verwendet. Die Gesamt-Gelgröße betrug 73 x 82 x 0,75 mm (Höhe x Breite x Dicke). Es wurden in der Regel Kämme mit 10 Taschen benutzt. Sollte das Gel nachfolgend für den gleichzeitigen Test mehrerer Antikörper auf einem Western Blot verwendet werden, so wurde ein 2-D-Kamm (Bio-Rad) verwendet.

Die SDS-PAGE wurde modifiziert nach HARLOW & LANE (1988) basierend auf der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt (verwendete Lösungen sowie Pipettierschema [Tab. 5] siehe unten).

Das reine Hämolymp-Plasma (ohne AC-Saline) wurde gegebenenfalls mit SDS-Sammelgelpuffer verdünnt. Alle Proben (Hämozyten-Lysat, Hämolymp-Plasma, Proben aus der Affinitätspräzipitation) wurden mit 5fach-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C denaturiert (Heizblock SHT, Stuart Scientific, Redhill, Surrey, UK), bei 13.000 rpm 2-3 min abzentrifugiert und der Überstand in die Geltaschen pipettiert. Für die Beschickung der Probentaschen wurden in der Regel Proben eingesetzt, die gleiche Volumina an (unverdünnter) Hämolymphe enthielten und nicht Proben mit gleichem Proteingehalt, da dies einen relativen Vergleich der Proteinzusammensetzung in der Hämolymphe von immunkompetenten mit naiven Tieren erlaubte (BECKAGE & KANOST 1993).

Die Proben wurden bei einer konstanten Spannung von 50 V im Sammelgel fokussiert und bei 100 V so lange aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreichte.

Zur Detektion der Proteine wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt oder bei nur geringem Proteingehalt einer Silberfärbung unterzogen



oder die Proteine wurden zur Immundetektion (Western-Blotting-Verfahren) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert (Kap. 2.2.13).

Die Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 erfolgte modifiziert nach WILSON (1983): Das Gel wurde mindestens 1 h oder über Nacht in Coomassie-Fixier-Färbelösung bei Raumtemperatur fixiert und danach in Coomassie-Entfärber mit mehrfachem Wechsel des Entfärbers so lange inkubiert, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war und einzelne Banden deutlich zu erkennen waren. Der Entfärber konnte nach der Benutzung mit Aktivkohle wieder regeneriert werden.

Die Silberfärbung wurde nach BLUM et al. (1987) mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Der erste Waschschrift mit 50 % (v/v) Ethanol nach der Fixierung erfolgte nur einmal für mindestens 20 min. Der Entwicklungsvorgang dauerte meist nicht länger als 5 min und wurde abweichend von den Angaben der Autoren sofort mit Stopplösung abgebrochen. Befand sich das gefärbte Gel in der Wasch- und Lagerlösung, so konnte es darin auch für mehrere Tage bei Raumtemperatur aufgehoben werden.

Zum Trocknen der gefärbten Gele wurden diese zunächst so lange in A. deion. gewässert, bis Ethanol und Essigsäure ausgewaschen waren, zwischen zwei Einmachfolien in Plexiglas-Rahmen aufgespannt und dann mehrere Tage bei 8–10 °C getrocknet.

### **30,8 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung**

Acrylamid	30,00 % (w/v)
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	0,80 % (w/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

### **Trenngelpuffer (pH 8,8 / 0,75 M)**

Tris-Base	0,75 mM *
SDS	0,20 % (w/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

\* für 1 l Trenngelpuffer: 77,0 g Tris-Base + 18,6 g Tris-HCl

**Sammelgelpuffer (pH 6,8 / 0,33 M)**

Tris-Base	0,33 M
SDS	0,20 % (w/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

**Elektrodenpuffer (pH ≈ 8,5)**

Tris-Base	0,05 M
Glycin	0,19 M
SDS	0,10 % (w/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

**Ammoniumperoxodisulfat (APS)**

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

**5fach SDS-Probenpuffer**

Sammelgelpuffer	2,5 ml
Glycerin	5,0 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
2 % (w/v) Bromphenolblau	20,0 µl
SDS	1,0 g

Nach Verdünnung der Proben lag der Probenpuffer stets in einfacher Konzentration vor.

**Tab. 5:** Pipettierschema für Sammelgel (SG) und Trenngel (TG) für jeweils 2 Gele in der Mini Protean II Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad)

<b>Acrylamidkonzentration:</b>	<b>5 % (SG)</b>	<b>12 % (TG)</b>
30,8 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung	0,85 ml	4,00 ml
Sammelgelpuffer	2,50 ml	-
Trenngelpuffer	-	5,00 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	1,60 ml	0,96 ml
TEMED*	10,00 µl	4,00 µl
10 % (w/v) APS	40,00 µl	40,00 µl

\* N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin

**Coomassie-Fixier-Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blue R 250	2,5 g
Essigsäure (100 %)	92,0 ml
Ethanol (99,8 % v/v)	454,0 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	454,0 ml

**Coomassie-Entfärber**

Essigsäure (100 %)	100,0 ml
Ethanol (99,8 % v/v)	300,0 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	600,0 ml

**2.2.13 Western-Blotting-Verfahren**

Sollten Proteine mit Hilfe von Antikörper im Hämolymp-Plasma oder im Hämocytenlysat nachgewiesen werden, so wurden die vorher elektrophoretisch aufgetrennten Hämolympproteine auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran transferiert, auf der dann die Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt wurde (Roti-PVDF Transfermembran, Roth, oder Millipore Imobilon-P Transfermembran, Millipore; Vorbereitung der Membranen jeweils nach Herstellerangaben).

Der Transfer (Transfer-Blot-Kammern von Chemie und Werkstoff Technik, Idstein) wurde nach dem Semidry-Verfahren (modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN 1984) durchgeführt. Dabei wurde der Elektrobplot nach folgendem Schema aufgebaut (von unten nach oben): Auf die Anode wurden 9 Lagen in Puffer A getränkte Filterpapiere (Gel Blotting-Papier GB002, Schleicher & Schuell) gelegt. Es folgten 3 Lagen in Puffer B getränkte Filterpapiere, auf die dann die einige Minuten zuvor in Puffer B inkubierte PVDF-Membran gelegt wurde. Darauf wurde das Polyacrylamidgel platziert, das zuvor einige Minuten in Puffer C gelagert worden war. Zum Schluss wurden 9 Lagen in Puffer C getränkte Filterpapiere und darauf die Kathodenplatte gelegt. Sowohl die Größe der Filterpapiere als auch der PVDF-Membran wurden der Größe des Gels entsprechend aufeinander abgestimmt. Die Transferbedingungen waren  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche für 1 h.

Nach Abschluss des elektrophoretischen Transfers wurde die PVDF-Membran für mindestens 1 h in 5 % (w/v) Milch-TBS (Milch als fettreies Magermilchpulver)

blockiert. Zuvor wurde gegebenenfalls ein Kontrollstreifen z. B. mit Markerproteinen für eine Färbung mit Amidoschwarz (modifiziert nach KUNO & KIHARA 1967) abgeschnitten. Dieser Streifen wurde einige Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und dann unter visueller Kontrolle und durch mehrfachen Wechsel des Amidoschwarz-Entfärbers von überschüssiger Färbelösung befreit. Nach dem Blockieren wurde die PVDF-Membran mit primärem Antikörper über Nacht bei 8–10 °C unter Schwenken inkubiert.

Sollten gleichzeitig mehrere Antikörper auf einer Blotmembran getestet werden, so wurde für die Inkubation des primären Antikörpers der Mini-Protean II Multiscreen Apparatus (Bio-Rad) nach Anleitung verwendet.

Am nächsten Morgen wurde die Membran viermal für je 15 min mit einer Tween-BSA-TBS gewaschen, mit sekundärem Alkalische-Phosphatase(AP)-gekoppeltem Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und wieder viermal für je 15 min mit Tween-BSA-TBS gewaschen.

Es folgte nun die enzymatische Farbreaktion, die die Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe von 5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitrotetrazoliumblau-chlorid (NBT) sichtbar macht (nach BLAKE et al. 1984). Die Durchführung erfolgte nach HARLOW & LANE (1988) mit folgenden Änderungen: Der eigentlichen Enzymreaktion wurde eine 15-minütige Vorinkubation in AP-Entwicklungspuffer vorangestellt. Die BCIP- und die NBT-Stammlösungen wurden in Dimethylsulfoxid und nicht in Dimethylformamid angesetzt und die Enzymreaktion wurde durch Waschen der PVDF-Membran mit A. deion. gestoppt.

verwendete Lösungen für den Western Blot (sofern anders als bei HARLOW & LANE (1988) beschrieben):

**Puffer A (pH 10,4)**

Tris-Base                      0,300 M  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

**Puffer B (pH 10,4)**

Tris-Base                      0,025 M  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

**Puffer C (pH ≈ 9,4)**

Tris-Base                      0,025 M  
6-Amino-hexansäure        0,040 M  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

Puffer C wurde immer frisch angesetzt.

**Amidoschwarz-Färbelösung**

Amidoschwarz 10-B	0,1 % (w/v)
2-Propanol	25,0 % (v/v)
Essigsäure	10,0 % (v/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

**Amidoschwarz-Entfärber**

2-Propanol	25,0 % (v/v)
Essigsäure	10,0 % (v/v)
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

**Tween-BSA-TBS**

Tween 20	0,05 % (v/v)
BSA	0,10 % (w/v)
in TBS	

**AP-Entwicklungspuffer (pH 9,5)**

NaCl	100 mM
Tris-Base	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

**BCIP-Stammlösung**

BCIP*	5 % (w/v)
in Dimethylsulfoxid (DMSO)	

**NBT-Stammlösung**

NBT*	5 % (w/v)
in DMSO	

\*(BioTech Trade & Service, St. Leon-Rot)

Es wurden monoklonale Antikörper gegen *M. sexta*-Hämozyten (z. B. MS#78) bzw. gegen *D. melanogaster*-Hämozyten sowie polyklonale Antikörper anti-Lysozym, anti-Hämolin und anti-Attacin mit den entsprechend spezifizierten sekundären Antikörpern verwendet (siehe dazu Kap. 2.1.5).

**2.2.14 Molekulargewichtsbestimmung**

Das Molekulargewicht des im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper MS#78 detektierten Antigens wurde anhand von Eichproteinen (Marker) über den Rf-Wert berechnet.

$$R_f = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Proteins}}{\text{zurückgelegte Strecke der Lösemittelfront}}$$

### 2.2.15 Screening von cDNA-Expressionsbanken mit monoklonalen Antikörpern

Es standen zwei  $\lambda$ ZAP-cDNA-Expressionsbanken zur Verfügung, die aus der mRNA von Hämozyten bzw. von Fettkörpern induzierter *M. sexta*-Larven (L5d2) hergestellt worden waren (SCHOLZ 2002). Sie wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen *M. sexta* gescreent.

Der Ablauf basiert auf SAMBROOK et al. (1989) mit verschiedenen Abweichungen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

#### 2.2.15.1 Titration der cDNA-Banken

Zunächst wurde die Konzentration der Phagen beider cDNA-Banken als *plaque forming units* (pfu) bestimmt. Dazu wurde das Wirtsbakterium *E. coli* XL1-Blue MRF' in LB-Medium mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, dann mit 2.000 x g für 25 min bei 4 °C pelletiert und das Bakterien-Pellet mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Von beiden cDNA-Banken wurden jeweils verschiedene Verdünnungen in Sodium-Magnesium(SM)-Puffer angelegt und 50 µl einer solchen Verdünnung mit 200 µl der vorbereiteten *E. coli*-XL1-Blue MRF'-Suspension vermischt. Diese Mischung wurde zu 3 ml bei 48 °C flüssig gehaltenem NZY-Top-Agar gegeben, kurz vermischt und sofort auf eine bei 37 °C vorgewärmte NZY-Bottom-Agar-Platte ausgegossen. Nachdem der Top-Agar auspolymerisiert war, wurden die Platten so lange bei 37 °C inkubiert, bis deutliche Plaques erkennbar waren. Die Platten, auf denen möglichst viele, aber noch gut zählbare Einzelplaques erkennbar waren, wurden zur Berechnung der Phagenkonzentration der cDNA-Banken herangezogen.

Außerdem wurde die Phagenkonzentration bzw. -verdünnung bestimmt, die für das Screening am besten geeignet erschien: So sollten nach dem Erscheinen der ersten Plaques und dem anschließenden Auflegen der Nitrozellulose-Membran für 2,5 h bis max. 4 h (siehe unten) immer noch Einzelplaques erkennbar sein.

Alle Medien und Lösungen wurden sofern nicht anders erwähnt autoklaviert. Wenn ein pH-Wert explizit genannt wird, so wurde die Lösung beim Ansetzen entsprechend eingestellt.

**LB-Medium (pH 7,0)**

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,0 ml

**Maltose-Stammlösung** (steril filtriert)

20 % (w/v) Maltose-Stammlösung in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

**MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung** (steril filtriert)

1 M MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

**SM-Puffer** (steril filtriert)

NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
1 M Tris-HCl (pH7,5)	50,0 ml
2 % (w/v) Gelatine	5,0 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,0 ml

**0,7 % (w/v) NZY-Top-Agar (pH 7,5)**

NaCl	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NZ-Amine A (Caseinhydrolysat)	10,0 g
Agar-Agar	7,0 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,0 ml

**1,5 % (w/v) NZY-Bottom-Agar (pH 7,5)**

NaCl	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NZ-Amine A (Caseinhydrolysat)	10,0 g
Agar-Agar	15,0 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,0 ml

### **2.2.15.2 Erstes Screening der cDNA-Banken mit einem monoklonalen Antikörper**

Wie bei der Titration der cDNA-Banken beschrieben, wurden 20 µl einer geeigneten Verdünnung der Phagen (Hämozyten cDNA-Bank: 4.000 pfu/Agar-Platte mit ø 94 mm, Fettkörper cDNA-Bank: 5.000 pfu/Agar-Platte) zusammen mit 200 µl *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>'</sup> in 3 ml NZY-Top-Agar auf NZY-Bottom-Agarplatten aufgebracht und bei 37 °C so lange inkubiert, bis erste Plaques sichtbar wurden (5,5–7,0 h).

Dann wurde die Nitrozellulose-Membran auf den NZY-Top-Agar aufgelegt und die Platte für weitere 2,5 bis max. 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Nitrozellulose-Membran war wie folgt vorbereitet worden (Hybond<sup>TM</sup>-C extra Nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia):

Zuerst war die Membran der Größe der Agarplatte entsprechend zugeschnitten worden. Anschließend wurde sie in einer Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung getränkt, getrocknet und vorsichtig luftblasenfrei auf die Agarplatten aufgebracht.

Nach der Inkubation der Platten mit den Nitrozellulose-Membranen wurden die Platten zunächst für 0,5–1 h bei 8–10 °C aufbewahrt, was das anschließende Abheben der Membran erleichterte. Vor dem Abheben musste jedoch noch die Position der Membran auf der Platte eindeutig markiert werden. Danach wurden die Agarplatten bei 8–10 °C bis zur Entwicklung des Röntgenfilms aufbewahrt (siehe unten).

Die Membranen wurden nach dem Abheben von den Platten zweimal kurz in großen Volumina von Tween-TBS und anschließend dreimal 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach der einstündigen Blockierung der Membran mit 5 % (w/v) Milch-Tween-TBS unter Schwenken bei Raumtemperatur, wurde die Membran noch einmal mit Tween-TBS gewaschen. Sie wurde mit dem unverdünnten monoklonalen Antikörper zunächst 3 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4–8 °C auf einem Rotationsschüttler (Typ 3005, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte à 10 min mit Tween-TBS. Daran an schloss sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter Schwenken mit dem sekundären Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war und 1:5.000 mit 1 % (w/v) BSA-Tween-TBS verdünnt wurde (siehe Kap. 2.1.5). Im Anschluss daran wurde die



Membran dreimal 10 min mit Tween-TBS gewaschen sowie einmal 10 min mit TBS.

Das Visualisieren der Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Membran erfolgte mit den ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (RPN2132, Amersham Pharmacia, Freiburg). Die Membran wurde nach Herstellerangaben mit den Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 im Dunkeln für 5 min überschichtet. Nach dem Entfernen der Lösungen wurde sie (zwischen Folien) zur Autoradiografie für 5–10 min auf einen Röntgenfilm gelegt.

### **IPTG-Lösung**

IPTG	0,01 M
in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	

### **Tween-TBS**

Tween 20	0,50 % (v/v)
in TBS	

Waren nach dem Entwickeln positive Spots auf dem Röntgenfilm zu sehen, wurde deren Position auf den Agarplatten markiert und die zugehörigen Plaques mit dem dicken Ende einer Pasteurpipette ausgestochen. Jede Plaque wurde in 300–500 µl SM-Puffer mit 2 Tropfen Chloroform für 24–48 h bei 4–8 °C inkubiert, um die Phagen in den Puffer zu überführen.

### **2.2.15.3 Zweites und weitere Screenings der potentiell positiven Klone**

Da beim ersten Screening aufgrund der relativ nah beieinander liegenden Plaques oft mehr als eine Plaque ausgestochen wurde, war zur Isolierung eines einzelnen positiven Klons mindestens noch ein zweites Screening notwendig. Dazu wurde zunächst wie oben beschrieben die Konzentration der beim ersten Screening gewonnen Phagen in SM-Puffer ermittelt und dann folgten die gleichen Schritte wie beim ersten Screening, jedoch sollte eine Agarplatte nun deutlich weniger Plaques enthalten. Einzelne Plaques wurden ab dem zweiten Screening mit dem spitzen Ende einer Pasteurpipette ausgestochen. Das Agarstück wurde wieder mit Chloroform in 300 µl SM-Puffer inkubiert.

In der Regel wurde noch ein drittes und gegebenenfalls ein viertes Screening durchgeführt, um die Isolation einzelner Klone zu gewährleisten.

Bei jedem Schritt wurden immer mehrere positive Klone vereinzelt bzw. isoliert.

Für das weitere Vorgehen wurden nun zunächst Phagen-Stammkulturen der isolierten positiven Klone angelegt.

Waren die Phagen des letzten Screening-Schrittes nach 24–48 h aus dem Agar in den SM-Puffer übergetreten, so wurde auch hier nach dem oben beschriebenen Schema die Phagenkonzentration bestimmt und ein "totales" Platten-Lysat mit 20.000–30.000 pfu/Platte angefertigt. Die Platten wurden dazu über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen waren die gesamten Bakterien  $\pm$  vollständig lysiert. Auf jede Platte wurden 5–10 ml SM-Puffer pipettiert und 24 h bei 4–8 °C unter vorsichtigem Schwenken (Rotationsschüttler) inkubiert, so dass die Phagen in den Puffer übertreten konnten. Der SM-Puffer, in dem sich nun die Phagen befanden, wurde abzentrifugiert (2.000 x g, 25 min, 4 °C) und der Überstand als Phagen-Stammkultur bei 4 °C gelagert. Die Konzentration wurde bestimmt; sie sollte mehr als  $10^5$  pfu/250  $\mu$ l betragen.

#### **2.2.15.4 *In-vivo*-Exzision (Einzelklon-Exzision) der Phagemide**

Die *in-vivo*-Einzelklon-Exzision der Phagemide folgte dem Protokoll "ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain", Kapitel "Single-Clone Excision Protocol" (Catalog #200253 Revision #017002 von Stratagene) mit kleineren Modifikationen:

Die Phagen-Stammkultur wurde auf die oben beschriebene Weise mit einem "totalen" Plattenlysats gewonnen.

ÜN-Kulturen (schüttelnd bei 30 °C) von *E. coli* XL1-Blue MRF' und *E. coli* SOLR (*E. coli* XL1-Blue MRF' in LB-Medium mit 0,2 % w/v Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub>; *E. coli* SOLR in LB-Medium) wurden mit 1.000 x g für 25 min bei 4 °C abzentrifugiert, das Bakterien-Pellet in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und jeweils auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 verdünnt (entspricht ca.  $8 \times 10^8$  Zellen/ml). 200  $\mu$ l dieser *E. coli* XL1-Blue MRF'-Suspension wurden mit 250  $\mu$ l der Phagen-Stammkultur, die mindestens  $10^5$  Phagen-Partikel/250  $\mu$ l enthalten sollte, und mit 1  $\mu$ l des ExAssist-Helfer-Phagen (Mindestkonzentration  $\geq 10^6$  pfu/ $\mu$ l) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 3 ml LB-Medium hinzugefügt und es folgte eine weitere

Inkubation für 3 h bei 37 °C unter Schütteln. Danach wurde die Suspension für 20 min auf 65–70 °C erhitzt und abschließend mit 1.000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand enthielt nun das ausgeschnittene pBluescript-Phagemid verpackt in filamentöse Phagen-Partikel.

Diese wurden nun zur Vermehrung in *E. coli* SOLR eingebracht, indem verschiedene Mengen des ausgeschnittenen Phagemids (z. B. 10 µl oder 100 µl oder verschiedene Verdünnungen) jeweils mit 200 µl der eingestellten *E. coli* SOLR ÜN-Kultur (siehe oben) 15 min bei 37 °C inkubiert wurden. 200 µl jeder Kultur wurden auf LB-Ampicillin-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen sollten Einzelkolonien sichtbar sein. Einzelkolonien wurden wieder in Flüssigkultur genommen, um von ihnen Glycerin - tammkulturen zur langjährigen Aufbewahrung bei –80 °C anzufertigen.

#### **Ampicillin-Stammlösung** (steril filtriert)

Ampicillin\* 0,75 % (w/v)  
in Milli-Q-H<sub>2</sub>O

\*als Ampicillin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich)

#### **LB-Ampicillin-Agar mit $c_{\text{Ampicillin}} = 50 \mu\text{g/ml}$**

Zugabe von 0,667 ml Ampicillin-Stammlösung zu 100 ml LB-Agar nach dessen Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C.

Für weitere Medien etc. siehe auch Kapitel 2.2.15.1.

Die Klone lagen in Form von *E. coli* SOLR-Zellen vor. Sie enthielten den λ-Phagen, in dessen Plasmid-DNA cDNA von *M. sexta* integriert war.

### **2.2.16 Bestimmung der Insertgröße ausgewählter Klone**

Die Bestimmung der Insertgröße ausgewählter Klone wurde mit zwei verschiedenen Techniken durchgeführt. Zum einen wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* SOLR präpariert und diese mit Restriktionsenzymen verdaut, der Verdau mit einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert und die Größe der Fragmente im mit Hilfe eines Markers annähernd bestimmt. Zum anderen wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) genutzt (modifiziert nach SAIKI

et al. 1985 und nach SAIKI et al. 1988) und die cDNA-Inserts mit geeigneten Primern amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarosegel.

#### **2.2.16.1 Präparation der Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA-Präparationen wurden mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Kits nach den Herstellerangaben durchgeführt. Ausgangsmaterial waren die in Kapitel 2.2.15.4 erwähnten Einzelkolonien oder die Glycerin-Stammkulturen, von denen zuvor Flüssigkulturen angelegt worden waren.

#### **2.2.16.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Die durch Plasmid-Präparation gewonnene DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI (jeweils 10 U/μl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut, für die Schnittstellen im Plasmid vorhanden sind und über die die cDNA einkloniert worden war. Es wurde ein Restriktionsverdau mit beiden Enzymen und je 1 μl cDNA für die Dauer von 60 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 20-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

#### **2.2.16.3 PCR zur Bestimmung der Insertgröße ausgewählter Klone**

Zur Größenbestimmung der Insert-cDNA wurde außerdem die Methode der Polymerase Kettenreaktion, PCR, verwendet. Es wurden die zum Phagemid pBluescript SK<sup>-</sup> passenden T3-Primer und T7-Primer (100 ng/μl, Roth) verwendet (siehe Protokoll "Lambda ZAP II Undigested Vector Kit" Catalog #236201, Revision #107002a, Stratagene). Als Matrizen dienten die in Kapitel 2.2.16.1 gewonnenen Plasmide ausgewählter Klone.

Die Reaktionsansätze (20 µl) wurden in sterilen PCR-Reaktionsgefäßen für PCR-Thermocycler mit Heizdeckel (Cyclon 25, Peqlab, Erlangen) angesetzt:

10x PCR-Puffer	2,00 µl
DNA-Matrize	0,50 µl
T3-Primer (10 pmol/l)	0,20 µl
T4-Primer (10 pmol/l)	0,20 µl
dNTPmix (10 mM)	0,40 µl
Taq-Polymerase (40 U/µl)	0,25 µl
Milli-Q-H <sub>2</sub> O (steril)	16,45 µl

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

einleitende Denaturierung	94 °C	3 min
gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus:		
Denaturierung	94 °C	45 s
Annealing	55 °C	45 s
Elongation	72 °C	90 s
abschließende Elongation	72 °C	10 min

#### **10x PCR-Puffer (MÜLHARDT 2002)**

Tris-HCl (pH 8,8)	200 mM
KCl	100 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
BSA	1 mg/ml

#### **2.2.16.4 Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Auswertung des Restriktionsverdau und der PCR wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet.

Zehn Mikroliter einer Probe aus dem Restriktionsverdau wurden mit 2,5 µl 5fach-Probenpuffer (siehe unten) versetzt. Zehn Mikroliter davon wurden in eine Tasche des Agarosegels eingebracht. Fünf Mikroliter des PCR-Produkts wurden mit 1,25 µl 5fach-Probenpuffer vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Trennung wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V für ca. 30 min

durchgeführt, bis die Bromphenolblau- und die Xylencyanol-Bande des Markers gut voneinander getrennt waren.

Zur Visualisierung wurde das Agarosegel für 30 min bei Raumtemperatur in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt (modifiziert nach SHARP et al. 1973), danach wurde überschüssiges Ethidiumbromid ebenfalls für 30 min in Milli-Q-H<sub>2</sub>O entfernt. Das Gel wurde dann unter UV-Licht ausgewertet (Mini-UV-Leuchttisch TCP-20.C, Vilber Lourmat, Marne-La-Valle, F) und gegebenenfalls fotografiert (Polaroid GelCam Handkamera mit Tuben GH10 (0,8x) und GH20 (0,4x) und Film Polapan 667 (3.000 ASA), Polaroid Corporation, Waltham, MA, USA).

#### **50x TAE (Tris-Acetat)-Puffer** (SAMBROOK et al. 1989)

Tris-Base	242,0 g
Essigsäure (100 %)	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100,0 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000,0 ml

(für alle Anwendungen wurde der Puffer 1:50 mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O verdünnt)

#### **1 % Agarose**

Agarose	1 % (w/v)
in 1x TAE-Puffer	

#### **5fach-Probenpuffer** (modifiziert nach MÜLHARDT 2002)

Sucrose	4 g
Glycerin	3 ml
0,05 M EDTA	7 ml
Xylencyanol	5 mg
Bromphenolblau	5 mg

#### **Ethidiumbromid-Lösung**

Ethidiumbromid	5 mg
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

## 2.2.17 Erstellen einer EST-Bank

Das Erstellen einer Bank aus Expressed Sequences Tags (ESTs) wurde die cDNA-Hämozytenbank zunächst titriert (Kap. 2.2.15.1). Daran an schloss sich die Exzision der Phagemide und das Ausplattieren zufällig ausgewählter Klone auf LB-Ampicillin-Agar.

### ***In-vivo*-Exzision der Phagemide (Exzision in großem Maßstab)**

Für die *in-vivo*-Exzision von Phagemiden im größeren Maßstab (siehe Protokoll "ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain" Kapitel "Mass Excision Protocol", Catalog #200253, Revision #017002, Stratagene) wurde die Einzelklon-Exzision (Kap. 2.2.15.4) in folgenden Punkten abgeändert:

Für die Inkubation der Phagen cDNA-Bank mit *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> wurden Phagen im Verhältnis 1:10 zusammen mit ExAssist-Helfer-Phagen im Verhältnis 1:1 mit Bakterien gemischt. Nach der Vorinkubation zur Adhäsion der Phagen wurden 20 ml LB-Medium hinzugefügt. Darüber hinaus wurde wie bei der Einzelklon-Exzision verfahren.

Zur Vermehrung wurden die Phagen in unterschiedlichen Verdünnungen (z. B. 1 µl des Überstandes der ausgeschnittenen Phagemide auf 200 µl *E. coli* SOLR) in *E. coli* SOLR eingebracht, so dass nach dem Ausstreichen verschiedener Volumina der ÜN-Kultur auf LB-Ampicillin-Agarplatten und Inkubation mindestens auf einer der Agarplatten Einzelkolonien zu sehen waren.

Für das EST-Projekt wurde jedes Loch einer 96-Loch-Platte (Cellstar, U-shape, TC-Plate 96 well, Greiner Bio-One) mit je 200 µl LB-Ampicillin-Agar gefüllt. Nach dem Erkalten des Agars wurde jedes Loch mit je einer Kolonie beimpft, die von der eben beschriebenen LB-Ampicillin-Agarplatte gepickt worden war. Ein Kontrollausstrich des Klons auf einer weiteren LB-Ampicillin-Agarplatte und eine Glycerin-Stammkulturen wurden angefertigt, so dass eine eindeutige Zuordnung des Klons der Mikrotiterplatte zur Plattenkultur bzw. zur Glycerin-Stammkultur möglich war. Die 96-Loch-Platte sowie die LB-Ampicillin-Agarplatte wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die folgenden Schritte einschließlich der Plasmid-Präparation und der Sequenzierung der 96 Klone wurden von der University of Bath, Genomics Facility, Bath, UK, im automatisierten Verfahren durchgeführt (siehe Kap. 2.2.18). Die Agarplatte mit den Kontrollausstrichen wurde bis zur Bestimmung der Sequenzen bei 4 °C gelagert.

## 2.2.18 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der DNA-Konzentration notwendig. Sofern die Bestimmung nicht automatisch durch das Fotometer (Spectrofotometer SmartSpec 3.000, Bio-Rad) durchgeführt wurde, wurde sie nach folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

Die Sequenzierung der DNA erfolgte als Auftragsarbeit bei SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH). und für das EST-Projekt an der Universität von Bath.

In beiden Fällen erfolgte die Sequenzierung auf Grundlage der Kettenabbruch-Methode von SANGER et al. (1977): Die zu sequenzierende DNA wird als Matrize für die enzymatische Synthese neuer DNA verwendet. Es steht dafür ein Gemisch aus Desoxy- und Didesoxynukleotiden zur Verfügung. Letztere sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Werden die markierten Didesoxynukleotide in den DNA-Strang eingebaut, so führt dies zum Abbruch der Kette, so dass ein Pool aus DNA-Molekülen verschiedener Länge entsteht, der auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt und analysiert wird und so die Reihenfolge der Basen festgelegt werden kann (QIAGEN, 1998).

## 2.2.19 Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung mit bioinformatischen Methoden (Sequenzvergleiche)

Die Sequenzanalysen erfolgten mit verschiedenen Computerprogrammen. Für die Suche nach ähnlichen Sequenzen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene wurde das Programm Washington University Basic Local Alignment Search Tool Version 2.0 (WU-Blast2) des European Bioinformatics Institute (EBI) des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg; GISH, W. (1996-2003) <http://blast.wustl.edu>; STOESEER et al. 2002) verwendet.

Direkte Vergleiche bestimmter Sequenzen (Multiple Sequence Alignments) wurden mit dem Programm ClustalW des EMBL-EBI durchgeführt (THOMPSON et al. 1994).



Die Übersetzung der Nukleotidsequenzen (cDNA) in alle sechs Leserahmen erfolgte mit „DNA-Protein Translation“ von Expert Protein Analysis System (Expasy) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB; <http://www.expasy.org>, GASTEIGER et al. 2003).

Untersuchungen zur Hydrophobizität von Proteinen nach KYTE & DOOLITTLE (1982) erfolgten mit dem Programm „ProtScale“ (Standardeinstellungen, *Window Size* = 9) des Expasy-Servers.

Für die Motiv-Suche wurde das Programm „MyHits“ (FALQUET et al. 2002, PAGNI et al. 2004) verwendet. Dabei wurden die Prosite- (FALQUET et al. 2002) und die „Protein Families“ (Pfam)-Datenbank (BATEMAN et al. 2002) durchsucht.

Das Programm „Compute pI/Mw“ (BJELLQVIST et al. 1993 & 1994, WILKINS et al. 1998) wurde für die Berechnung des Molekulargewichts und des Isoelektrischen Punktes aus Aminosäuresequenzen benutzt.

Eine Vorhersage über das Vorhandensein einer abspaltbaren Signalpeptidsequenz des Proteins wurde mit dem Programm „SignalP 3.0“ (BENDTSEN et al. 2004, NIELSEN et al. 1997) getroffen.

Zur Voraussage von  $\alpha$ -Helices in Annexin wurde das Programm „PSIPRED“ Version 2.3 benutzt (JONES 1999, MCGUFFIN et al. 2000).

Mit „MEMSAT“ (über PSIPRED) wurden die Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein von Transmembranbereichen getestet (JONES 1998, JONES et al. 1994).

Vorhersagen zur dreidimensionalen Struktur wurden mit dem Programm 3D-PSSM Version 2.6.0 (KELLEY et al. 2000) getroffen.

Die Suche nach RGD- bzw. KGD(Lysin-Glycin-Aspartat)-Motiven wurde visuell durchgeführt.

## **2.2.20 Untersuchung des Annexin IX-Gens von *M. sexta***

Um die Anordnung der Isoform-spezifischen Sequenzen im Annexin IX-Gen von *M. sexta* zu untersuchen, wurde genomische DNA aus Hämocyten von *M. sexta* mittels PCR-Technik amplifiziert.

### **2.2.20.1 Gewinnung genomischer DNA aus Hämozyten als Matrize für die PCR**

Die Hämozyten wurden aus Larven des Stadiums L5d2–3 gewonnen (Kap. 2.2.4). Nachdem Waschen der Hämozyten wurde das Pellet in 1 ml AC-Saline aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden sie mit 200–300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß mit den pelletierten Hämozyten sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Das Reaktionsgefäß war mit einem Loch im Deckel versehen worden, der das Eindringen des flüssigen Stickstoffs erlaubte.

Die eigentliche Isolierung der genomischen DNA aus den Hämozyten erfolgte unter Verwendung von Chelex 100 (Molecular Biology Grade Resin, Bio-Rad) nach WALSH et al. (1991). Dazu wurden direkt nach der Entnahme des Reaktionsgefäßes mit den Hämozyten aus dem flüssigen Stickstoff 200 µl einer 5 %igen (w/v) Chelex-Stammlösung bei Raumtemperatur zugegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 55 °C inkubiert, 10 s kräftig durchmischt (Vortexer), im kochenden Wasserbad für 8 min inkubiert, nochmals für 10 s kräftig durchmischt (Vortexer) und für 3 min mit 13.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 D, siehe Kap. 2.1.1). Danach wurde der Überstand mit der genomischen DNA abgenommen und die DNA-Konzentration fotometrisch bestimmt (Kap. 2.2.18).

#### **Chelex 100-Stammlösung**

5 % (w/v) Chelex 100-Stammlösung in Milli-Q-H<sub>2</sub>O (steril)

### 2.2.20.2 Primer Design und Synthese

Zum Primer Design für die PCR mit der genomischen DNA als Matrize wurde das Programm Oligos Version 8.82 (1999-2001) von Ruslan Kalendar („PCR Team“, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, FIN) verwendet. Die Primer wurden für einen Bereich gewählt, der in der Isoform A- und in der Isoform C-spezifischen Sequenz der Annexin IX-cDNA lag (Abb. 44) und die Spleißstellen zwischen den spezifischen Sequenzen einschloss.

Forward Primer: 5'-GTTCGCGGTCGTCTGGGTGTG („Primer A-B left“)

Position 206

Reverse Primer: 5'-TAACAGTTATACGGGTCAAAGGC („Primer C-B right“)

Position 984

Die Länge des erwarteten PCR-Produktes lag bei 801 bp.

Die Synthese der Primer wurde als Auftragsarbeit von der Firma Seqlab erledigt.

### 2.2.20.3 Durchführung der PCR

Folgende Reaktionsansätze (20 µl) wurden in sterilen PCR-Reaktionsgefäßen für PCR-Thermocycler mit Heizdeckel (Cyclon 25, Peqlab) pipettiert:

10x PCR-Puffer (siehe Kap. 2.2.16.3)	2,00 µl
DNA-Matrize	1,00 µl
Primer A-B left (10 pmol/l)	1,00 µl
Primer C-B right (10 pmol/l)	1,00 µl
DNTP-Mix (10 mM)	0,40 µl
Taq-Polymerase (40 U/µl)	0,25 µl
Milli-Q-H <sub>2</sub> O (steril)	14,35 µl

Die eingesetzte Menge genomischer DNA als DNA-Matrize richtete sich nach deren Konzentration. Es wurden Konzentrationen von  $c = 100\text{--}150\text{ ng DNA}/\mu\text{l}$  Milli-Q-H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die DNA-Probe wurde gegebenenfalls mit sterilem Milli-Q-H<sub>2</sub>O verdünnt. Als Positiv-Kontrolle diente die cDNA des Klon MH6/1-8i1, die in einer Konzentration von  $\text{ca. } c = 50\text{ ng DNA}/\mu\text{l}$  Milli-Q-H<sub>2</sub>O eingesetzt wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde statt der DNA-Matrize Milli-Q-H<sub>2</sub>O verwendet.

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

einleitende Denaturierung	94 °C	5 min
gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus:		
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	53 °C	1 min
Elongation	72 °C	90 s
abschließende Elongation	72 °C	10 min

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Dafür wurden 2 µl PCR-Produkt mit 0,5–1,0 µl 5fach-Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen (siehe Kap. 2.2.16.4).

### **3 Ergebnisse**

Im Ergebnisteil wird zunächst dargestellt, welche Bakterien bzw. welche Komponenten der Oberfläche Gram-positiver Bakterien eine Immunantwort bei *M. sexta* auslösen (Kap. 3.1). Daran schließen sich die Untersuchungen über den Verbleib von injizierten Bakterien und den zeitlichen Verlauf der zellulären Abwehr an (Kap. 3.2). In Kapitel 3.3 werden Hinweise auf potenzielle Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien in der Hämolymphe von *M. sexta* dargelegt. Ergebnisse zur Identifizierung und Charakterisierung von Hämocytenproteinen mittels monoklonaler Antikörper, die möglicherweise für die zelluläre Abwehr wichtig sind, befinden sich in Kapitel 3.4. Zum Schluss werden die Ergebnisse des EST-Projektes zur Identifizierung von Hämocytengenen mittels cDNA-Klonen vorgestellt (Kap. 3.5)

#### **3.1 Analysen der Provokatorkompetenz verschiedener Bakterien bzw. isolierter bakterieller Komponenten zur Auslösung einer Immunantwort bei *M. sexta***

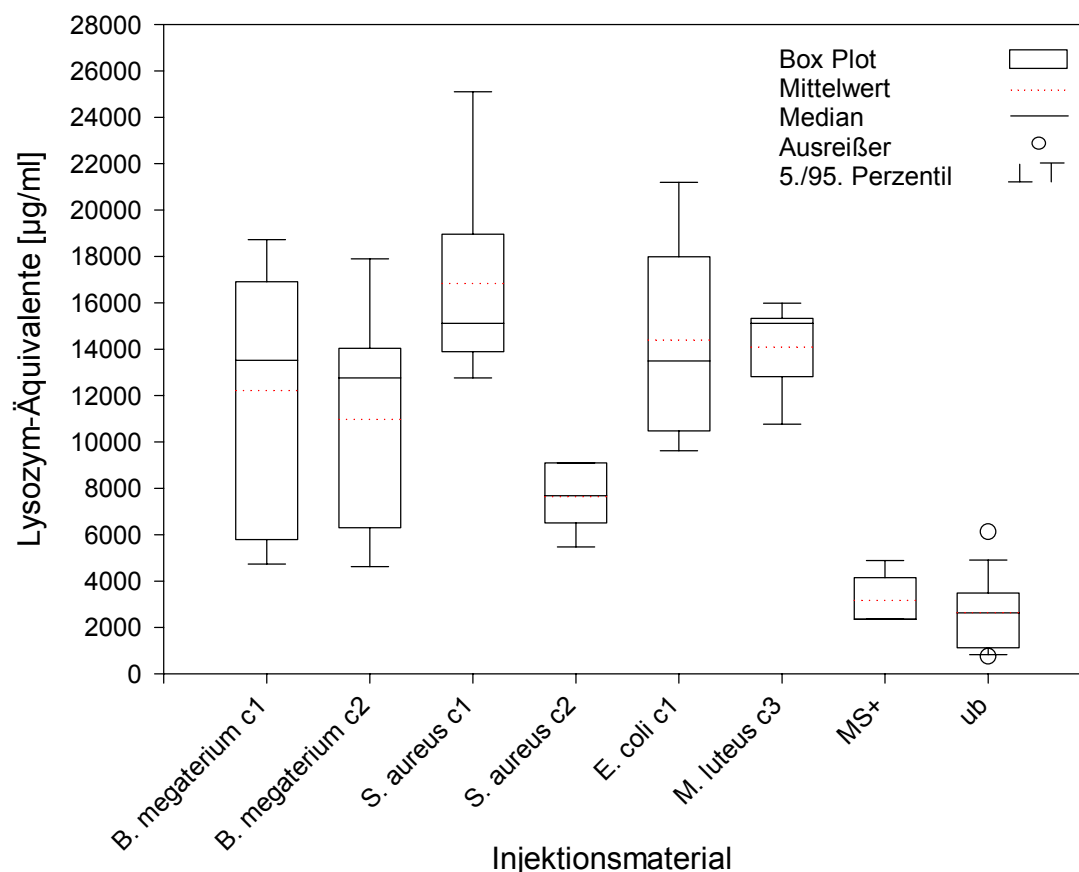
In den ersten Untersuchungen wurde zunächst festgestellt, ob und welche Gram-positiven Bakterien bzw. welche ihrer Oberflächenkomponenten sich als Provokatoren einer Immunantwort bei *M. sexta* eignen und eine humorale Immunantwort hervorrufen. Dies geschah unter Verwendung des Hemmhoftests gegen *M. luteus* zur Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität (Kap. 3.1.1), der elektrophoretischen Auftrennung von Hämolympheproteinen (Kap. 3.1.2), dem Nachweis antibakterieller Proteine in der Hämolymphe mittels Western-Blot-Analyse (Kap. 3.1.3) und immunhistologisch auf Hämocytenmonolayern (Kap. 3.1.4).

##### **3.1.1 Auswertung der Hemmhoftests zur Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität gegen *M. luteus***

Zunächst wurden verschiedene Bakterien (*B. megaterium*, *E. coli*, *M. luteus* und *S. aureus*) in *M. sexta*-Larven injiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Hämolymphe der Larven gewonnen. Mit dem Hemmhoftest wurde die bakteriolytische Aktivität der Hämolymphe gegen *M. luteus* als Lysozym-

Äquivalente bestimmt (Abb. 2). Die Daten zu Mittelwert und Median befinden sich im Anhang (siehe dort Tab. A1), die Rohdaten aller statistisch ausgewerteten Versuche befinden sich auf einer CD-ROM, die in der AG Prof. Dr. T. Tenczek, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, hinterlegt ist.

Jede Injektionsgruppe wurde sowohl gegen die MS<sup>+</sup>-Gruppe als auch gegen die ub-Gruppe getestet sowie die beiden gegeneinander. Ein Vergleich der bakteriolytischen Aktivität von Larvengruppen, die mit Bakterien infiziert worden waren, mit den Kontrollen (unbehandelte bzw. MS<sup>+</sup>-injizierte Larven) ergab im Mann-Whitney-Rank-Sum-Test einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) bezüglich der bakteriolytischen Aktivität bei allen Testpaaren; außer beim



**Abb. 2:** Bakteriolytische Aktivität in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven, die mit Bakterien infiziert worden waren, im Vergleich zu unbehandelten Larven (ub) bzw. solchen, denen Saline (MS<sup>+</sup>) injiziert worden war. Injektionsvolumen: 100 µl; Inkubationszeit bis zur Hämolymphabnahme: 24 h; Injektionsdosis: c1 = 10<sup>8</sup> Bakterien/ 100 µl, c2 = 10<sup>9</sup> Bakterien/100 µl, c3 = 10 µg lyophilisierter *M. luteus*/100 µl; *B. megaterium* c1 n = 6, ub n = 10, alle anderen n = 5.

Vergleich der beiden Kontrollgruppen miteinander. Wurden die Werte der mit verschiedenen Bakterien infizierten Larvengruppen miteinander verglichen, so ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen bis auf folgende Paarungen: Die Werte der *S. aureus* c2-Proben waren signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als die der Proben von *S. aureus* c1, *E. coli* bzw. *M. luteus* (Einzeldaten siehe Tab. A3 im Anhang).

In einer weiteren Untersuchung wurden verschiedene Komponenten der Oberfläche von *M. luteus* sowie intakte Bakterienzellen injiziert und die Hämolymphe ebenfalls im Hemmhoftest untersucht. Das Vergleich der bakteriolytischen Aktivität ist in Abbildung 3 in Lysozym-Äquivalenten dargestellt. Die Einzeldaten sind dem Anhang (Tab. A2) zu entnehmen.

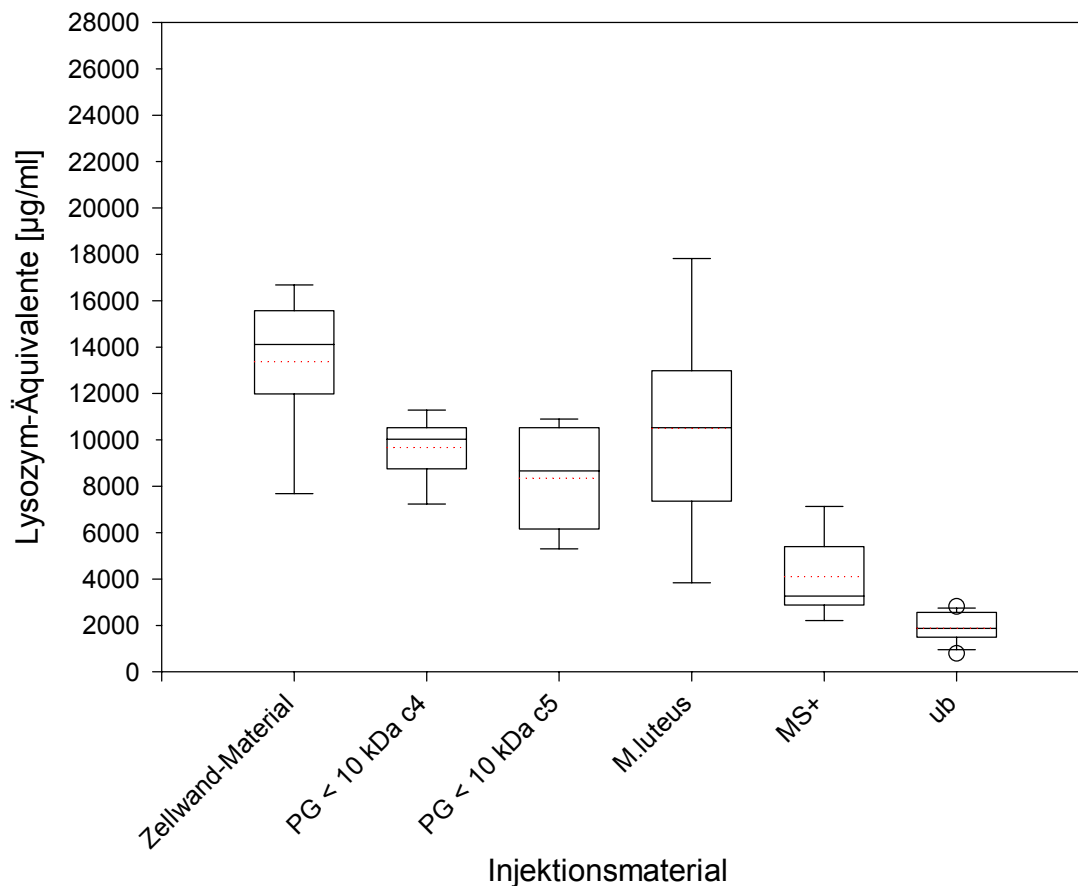
Der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der bakteriolytischen Aktivität zwischen den mit *M. luteus* bzw. mit bakteriellen Oberflächenkomponenten injizierten Larvengruppen und den Kontroll-Larven bei allen Testpaaren, auch beim Vergleich der Saline-injizierten Larven mit den unbehandelten Larven.

Ein paarweiser Vergleich der Daten von mit verschiedenen bakteriellen Oberflächenkomponenten injizierten Larvengruppen, zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der *M. luteus*-Gruppe. Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Gruppen, denen Peptidoglukan in den Konzentrationen c4 bzw. c5 injiziert worden waren. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) bezüglich der bakteriolytischen Aktivität ließen sich jedoch zwischen der Zellwand-Material-Gruppe und den beiden Peptidoglukan-Gruppen feststellen. Die Einzeldaten wie Mittelwert und Median zur Signifikanzberechnung befinden sich im Anhang (Tab. A4).

Zu Beginn der Untersuchungen wurde neben dem Hemmhoftest zur Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität gegen *M. luteus* noch ein weiterer Hemmhoftest zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* K12 D31 durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden, weder beim Vergleich zwischen den Hämolympfproben von Larven, denen *M. luteus* oder *E. coli* K12 D22 injiziert worden war, noch im Vergleich mit den Proben der Kontrolltiere. Um die Löcher aller Hämolympfproben zeigten sich 24 h nach der Inkubation der

Hemmhofplatten transparente Hemmhöfe, die auch 72 h nach der Inkubation klar blieben, was als bakterizide Aktivität in der Hämolymphe gegenüber *E. coli* K12 D31 interpretiert wurde. Der Hemmhofdurchmesser war bei den Proben der infizierten Tiere größer als bei den Proben der Kontrolltiere.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde dieser Hemmhoftest gegen *E. coli* nicht mehr durchgeführt.



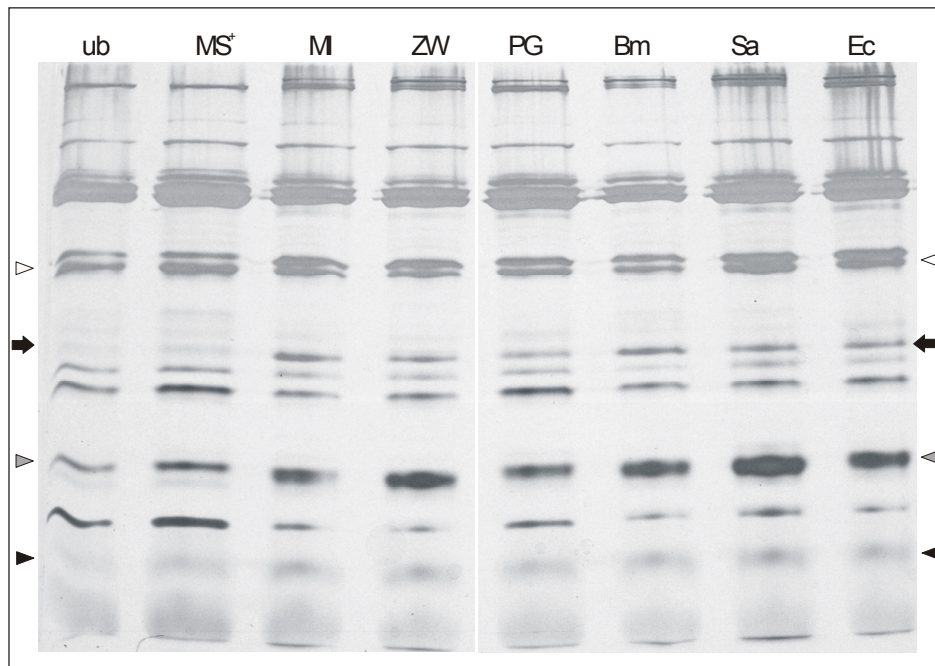
**Abb. 3:** Bakteriolytische Aktivität in der Hämolymphe von *M. sexta* Larven, denen verschiedene Oberflächen-Komponenten Gram-positiver Bakterien injiziert worden waren, im Vergleich zu unbehandelten Larven (ub) bzw. solchen, denen Saline (MS<sup>+</sup>) injiziert bzw. ganze Bakterienzellen (*M. luteus*) worden waren. Injektionsvolumen: 50 µl; Inkubationszeit bis zur Hämolymphabnahme: 24 h; Injektionsdosis: Zellwand-Material und *M. luteus* c = 50 µg lyophilisiertes Material/50 µl, c4 = 500 µg PG/50 µl, c5 = 50 µg PG/50 µl, PG = Peptidoglykan; Zellwand-Material und PG n = 8, *M. luteus* n = 7, MS<sup>+</sup> n = 5, ub n = 10. Legende siehe Abb. 2



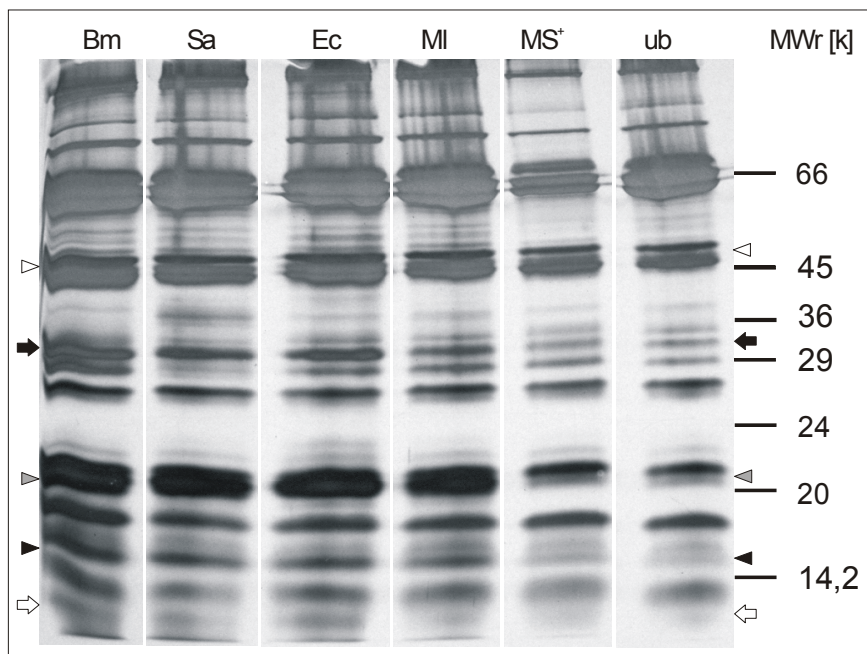
### **3.1.2 Vergleich der Proteinmuster zellfreier Hämolymphe von unbehandelten und mit Bakterien infizierten *M. sexta*-Larven (SDS-PAGE)**

Bei einem Vergleich der Proteinmuster der zellfreien Hämolymphe von unbehandelten und MS<sup>+</sup>-injizierten *M. sexta*-Larven mit solchen, denen Bakterien bzw. bakterielle Oberflächenkomponenten injiziert worden waren, waren besonders fünf Proteinbanden (gekennzeichnet durch Pfeilköpfe und Sterne, Abb. 4) bei den Hämolympheproben infizierter Larven stärker als bei den Kontrollen: Die Berechnung des relativen Molekulargewichts über die Markerproteine (Grafik dazu siehe Anhang, Abb. A1) für die drei mit Pfeilköpfen markierten Proteinbanden (Abb. 5), deren Identität in Kapitel 3.1.3 mittels Western-Blotting-Verfahren verifiziert wurde, ergab für Hämolin einen Wert von ca. 47 k und für Lysozym von ca. 15 k. Für das potentielle Attacin wurde ca. 21 k errechnet. Die beiden mit Sternen gekennzeichneten Proteinbanden wurden nicht weiter bestimmt. Ihr relatives Molekulargewicht lag um 30 k bzw. im niedermolekularen Bereich unter 14 k.

Sowohl die für die SDS-PAGE als auch für die Western Blots wurden die selben Proben verwendet, die auch in die Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität (Kap. 3.1.1 Abb. 2 und 3) eingegangen sind.



**Abb. 4:** Darstellung von Hämolympheproteinen von unbehandelten (ub) *M. sexta*-Larven und solchen, denen 24 h zuvor  $MS^+$ , Bakterien bzw. bakterielle Oberflächenkomponenten injiziert wurden. Die Pfeilköpfe bzw. die Pfeile weisen auf Banden hin, deren Intensität sich besonders stark verändert.  $MS^+$  = Vollsaline, Ml = *M. luteus*, ZW = Zellwand, PG = Peptidoglykan, Bm = *B. megaterium*, Sa = *S. aureus*, Ec = *E. coli*. (SDS-PAGE mit 12 % TG, Silberfärbung, ca. 0,27  $\mu$ l Hämolymphe/Spur)

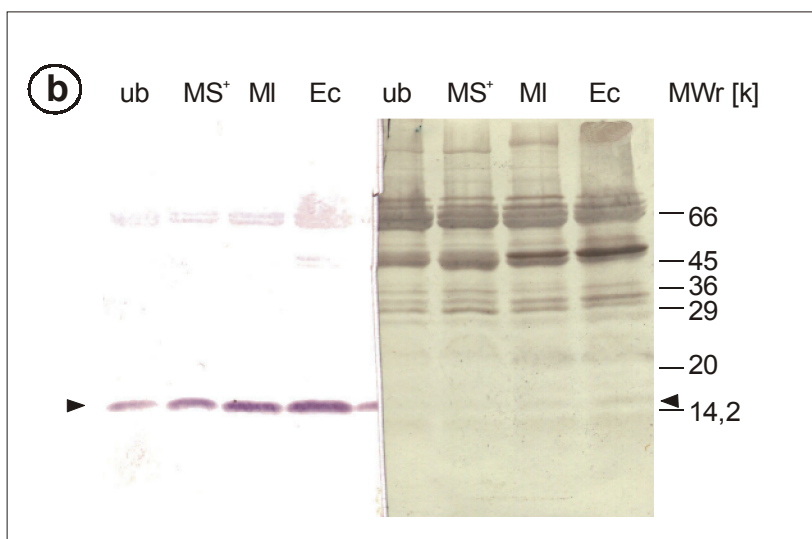
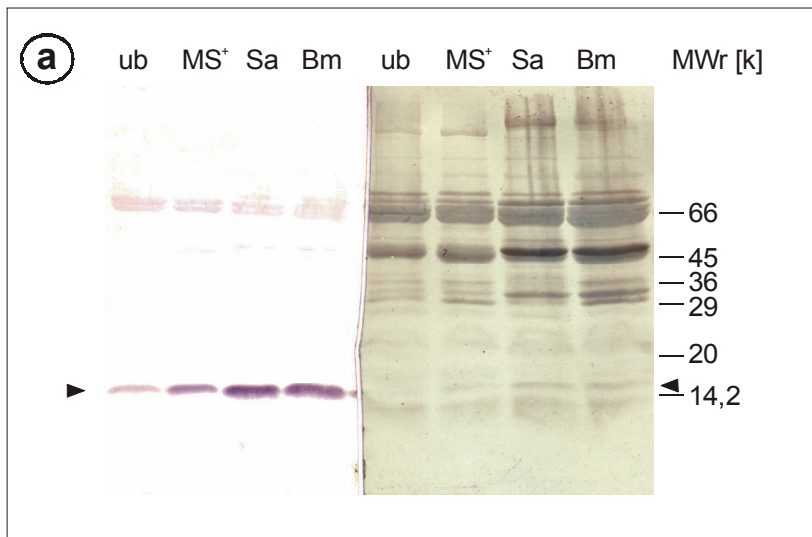


**Abb. 5:** Darstellung von Hämolympheproteinen von unbehandelten (ub) *M. sexta*-Larven und solchen, denen 24 h zuvor  $MS^+$  oder Bakterien injiziert wurden. Die Pfeilköpfe und Pfeile weisen auf Banden hin, deren Intensität sich besonders stark veränderte. Bm = *B. megaterium*, Sa = *S. aureus*, Ec = *E. coli*, Ml = *M. luteus*,  $MS^+$  = Vollsaline, MW<sub>r</sub> = relatives Molekulargewicht (Sigma Low Marker) (SDS-PAGE mit 12 % TG, Silberfärbung, ca. 0,27  $\mu$ l Hämolymphe/Spur)

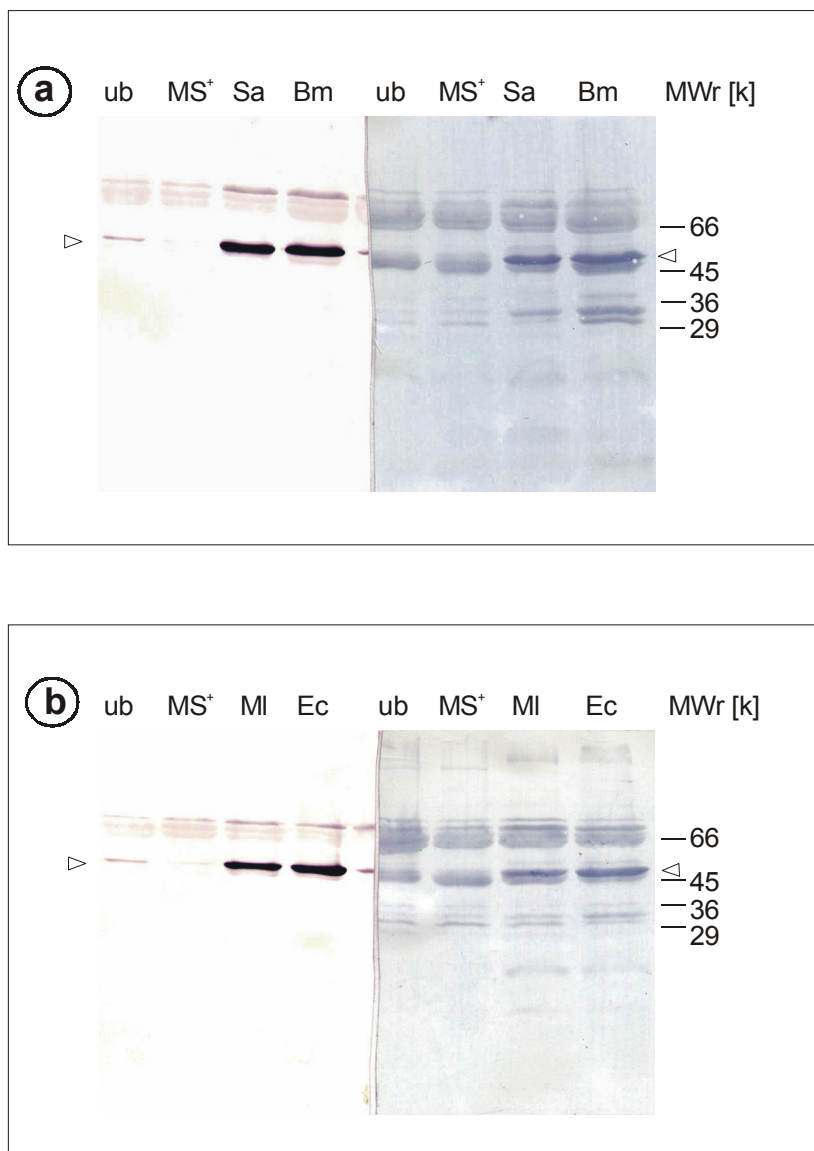
### 3.1.3 Nachweis von Hämolin und Lysozym in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven mit dem Western-Blotting-Verfahren

Unter Verwendung des anti-Lysozym- bzw. des anti-Hämolin-Antikörpers auf dem Western Blot konnten Lysozym und Hämolin in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven nachgewiesen werden. Die Intensität der Banden war bei den Hämolympheproben der mit Bakterien infizierten Larven stärker als bei den Kontrollen (Abb. 6 und 7, jeweils a und b).

Mit Hilfe des anti-Attacin-Antikörpers konnte im Western Blot mit den selben Proben keine Reaktion nachgewiesen werden.



**Abb. 6 a und b:** Nachweis von Lysozym (►◄) in der Hämolymphe von unbehandelten (*ub*) *M. sexta*-Larven und solchen, denen *MS*<sup>+</sup> oder Bakterien injiziert worden waren. *MS*<sup>+</sup> = Vollsaline, *MI* = *M. luteus*, *Bm* = *B. megaterium*, *Sa* = *S. aureus*, *Ec* = *E. coli*, MW = relatives Molekulargewicht (Sigma Low Marker) (Western Blot von SDS-PAGE mit 12 % TG: links Immunoblot, rechts Amidoschwarz-Färbung)



**Abb. 7 a und b:** Nachweis von Hämolin (▷◁) in der Hämolymphe von unbehandelten (ub) *M. sexta*-Larven und solchen, denen MS<sup>+</sup> oder Bakterien injiziert wurden. MS<sup>+</sup> = Vollsaline, MI = *M. luteus*, Bm = *B. megaterium*, Sa = *S. aureus*, Ec = *E. coli*, MW = relatives Molekulargewicht (Sigma Low Marker) (Western Blot von SDS-PAGE mit 12 % TG: links Immunoblot, rechts Amidoschwarz-Färbung)

### 3.1.4 Nachweis von Attacin, Hämolin und Lysozym in den Hämocyten von *M. sexta*-Larven (Monolayer)

Es wurden Hämocyten-Monolayer von unbehandelten *M. sexta*-Larven und von solchen, denen MS<sup>+</sup>, *E. coli* bzw. *M. luteus* injiziert worden waren, 24 h p. i. angefertigt und jeweils mit den polyklonalen Antikörpern gegen Attacin, Hämolin und Lysozym inkubiert. Zur Visualisierung wurde ein FITC-markierter sekundärer Antikörper verwendet.

Bei der Verwendung des anti-Attacin-Antikörpers zeigte sich ein indifferentes Bild: Auf den Hämozyten waren fluoreszierende Pünktchen (Ausnahme: Plasmatozyten: negativ) zu sehen, deren Intensität und Menge in der folgenden Reihenfolge zunahm:  $ub < MI < MS^+ < Ec$ .

Auch bei den Hämozyten, die mit dem anti-Hämolin-Antikörper inkubiert worden waren, waren die Plasmatozyten negativ, während die Granulen der Granulären Zellen insbesondere bei den Proben der mit Bakterien infizierten Larven positiv waren ( $ub < MS^+ < Ec < MI$ ).

Unter Verwendung des anti-Lysozym-Antikörpers ergab sich ein ähnliches Bild wie mit dem anti-Hämolin-Antikörper: Die Granulen der Granulären Zellen von mit Bakterien infizierten Larven zeigten eine deutliche Fluoreszenz. Dabei war die Intensität und Verteilung der fluoreszierenden Granulen bei der  $MS^+$ -Kontrolle bereits stark erhöht gegenüber der  $ub$ -Kontrolle. Dies steigerte sich nochmals bei den infizierten Tieren ( $ub < MS^+ < Ec \equiv MI$ ).

### **3.2 Untersuchungen über den Verbleib injizierter Bakterien und den Verlauf der zellulären Abwehr**

Für den Nachweis der Phagozytose von Bakterien durch Hämozyten wurden diese mit FITC markiert, in Larven von *M. sexta* injiziert und das Hämozytenbild zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Des Weiteren wurden Gewebe, insbesondere der Fettkörper, zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion präpariert (*whole-mount*-Präparate) und ebenfalls auf FITC-markierte Bakterien hin untersucht.

### 3.2.1 Beobachtungen an Hämozyten und Fettkörper von *M. sexta*-Larven nach Injektion verschiedener Bakterien

In diesem Versuch wurde der Verbleib von abgetöteten bzw. lyophilisierten FITC-markierten Bakterien, die ins Hämozöl von *M. sexta*-Larven (L4d1–4 und L5d2–3) injiziert worden waren, untersucht.

Die verschiedenen Hämozytentypen wurden zunächst im Frischzellpräparat morphologisch identifiziert und gegebenenfalls im fixierten Präparat (Monolayer) mit monoklonalen Antikörpern charakterisiert.

Wurde (lyophilisierter) *M. luteus* injiziert, so konnten diese Bakterien im **Hämozyten**-Frischzellpräparat bis auf eine Ausnahme (3 h p. i.) schon 1 h p. i. nicht mehr mikroskopisch nachgewiesen werden. In diesem Einzelfall waren die FITC-markierten *M. luteus* mit einem größeren Zellaggregat assoziiert, an dem überwiegend Plasmatozyten beteiligt waren. Die Zahl der Sphäruken Zellen war in Präparaten von infizierten Tieren offenbar höher als bei unbehandelten Larven.

Bei *E. coli*-Injektionen waren freie Bakterien 1 h p. i. im Plasma noch deutlich sichtbar, sie waren allerdings nicht mit Hämozyten assoziiert. Dies war jedoch 3 h und 5 h p. i. der Fall: *E. coli*-Zellen waren von Hämozyten aufgenommen worden bzw. mit ihnen assoziiert. Eine Unterscheidung zwischen Phagozytose und unspezifischer Bindung an die Hämozytenoberfläche konnte unter den vorliegenden Bedingungen nicht getroffen werden.

Insbesondere bei der Injektion von *B. megaterium* konnte folgender zeitlicher Ablauf beobachtet werden: 1 h p. i. wurden *B. megaterium*-Zellen zusammen mit Hämozyten-Aggregaten, die vorwiegend aus Plasmatozyten bestanden, an denen aber auch einige Granuläre Zellen beteiligt waren, beobachtet (Abb. 8). Es konnten fast keine Plasmatozyten entdeckt werden, die nicht an größeren oder kleineren Zellhaufen beteiligt waren oder nicht mit Bakterien assoziiert waren. Außerdem lagen noch viele einzelne *B. megaterium*-Zellen frei im Plasma vor. Ihre Zahl verringerte sich mit fortschreitender Zeit nach der Infektion, allerdings konnten auch 24 h p. i. noch einige freie Bakterien in der Hämolymphe beobachtet werden. Die Zahl der bakterienfreien bzw. nicht in Zellaggregaten vorliegenden Plasmatozyten war 3 h p. i. in der Hämolymphe wieder höher als 1 h p. i. Es waren jedoch immer noch viele Aggregate aus Bakterien, Plasmatozyten und Granulären Zellen zu sehen. Ein ähnliches Bild zeigte sich 5 h p. i. (Abb. 9 und 10), wobei die

Zahl der freien Plasmatozyten zunahm. Eine genauere Untersuchung kleinerer Zellaggregate ergab Hinweise auf die Phagozytose von Granulären Zellen und Bakterien durch Plasmatozyten (Abb. 11, 12 und 13). So wurden 24 h p. i. *B. megaterium*-Zellen überwiegend in oder angelagert an Granuläre Zellen gefunden (Abb. 14); Zellaggregate unter Beteiligung von Plasmatozyten zusammen mit *B. megaterium* waren immer noch vorhanden. Oenozytoide schienen nur vereinzelt (Abb. 14) mit *B. megaterium* assoziiert zu sein. Sphärule Zellen wurden so selten gefunden, dass keine Aussage über ihre Beteiligung an Hämozyten-Aggregationen oder gar Phagozytosevorgängen getroffen werden kann.

Auch bei der mikroskopischen Untersuchung des **Fettkörpers** und der Integument-Innenseite an der Injektionsstelle waren Ansammlungen von *E. coli*-Zellen sowohl 1 h als auch 3 h und 5 h p. i. zu sehen.

Lokale Ansammlungen von *M. luteus* waren an der Innenseite des Integuments 1 h p. i. bei den meisten der untersuchten Tiere zu finden. Je länger die Injektion zurück lag, desto schwächer und weniger „konzentriert“ fiel das FITC-Signal aus; 5 h p. i. war es nur noch vereinzelt schwach wahrnehmbar. Gleiches galt für die Fettkörperpräparate. Nach 15 h konnten weder am Fettkörper noch an der Integument-Innenseite *M. luteus*-Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden.

*B. megaterium* war zu allen untersuchten Zeitpunkten (1 h, 3 h, 5 h und 24 h) sowohl am Fettkörper als auch an der Innenseite des Integuments detektierbar. Es fiel jedoch auf, dass die *B. megaterium*-Zellen zunächst relativ weit über den Fettkörper verteilt waren (Abb. 15) und zu späteren Präparationszeitpunkten mehr und mehr in Aggregaten auftraten (Abb. 16 und 17). Darüber hinaus war der Fettkörper an einigen Stellen melanisiert, an denen sich Bakterien angesammelt hatten (Abb. 16 und 17). Außerdem traten Bakterien auch entlang von „Fasern“ auf, die das Fettkörperpräparat durchzogen (Abb. 18).

Die Malpighischen Gefäße stellten sich wegen ihrer starken Autofluoreszenz als für diesen Versuch ungeeignete Organe heraus.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

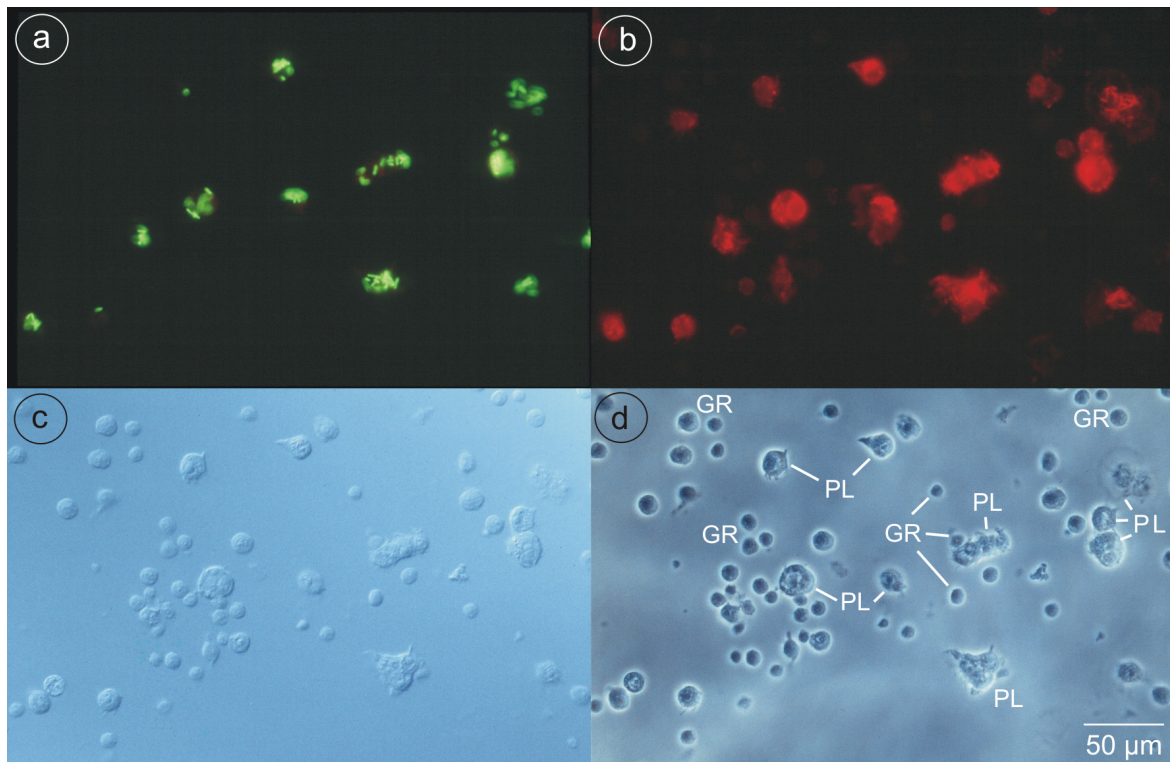
**Tab. 6:** Lokalisation von FITC-markierten Bakterien im Hämazöl von *M. sexta*-Larven zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion

injizierte Bakterienart	Organ- bzw. Hämozyten- Präparat von <i>M. sexta</i>	Untersuchungszeitpunkt p. i.				
		0,5 h	1 h	3 h	5 h	24 h
<i>M. luteus</i>	Fettkörper	-	-(+)/+	(+)	(+)/-	- (15 h)
	Integument-Innenseite	+	+	(+)	((+))/-	- (15 h)
	Hämozyten <sup>1)</sup>	-	-	-/+*	-	- (15 h)
	Plasma <sup>1)</sup>	-	-	-	-	- (15 h)
<i>E. coli</i>	Fettkörper		+	+	+	
	Integument-Innenseite		+	+	+	
	Hämozyten <sup>1)</sup>		-	+	+	
	Plasma <sup>1)</sup>		+			
<i>B. megaterium</i>	Fettkörper		+	+	+	+
	Integument-Innenseite		+	+	+	+
	Hämozyten <sup>1)</sup>		+	+	+	+
	Plasma <sup>1)</sup>		+	+	+	+

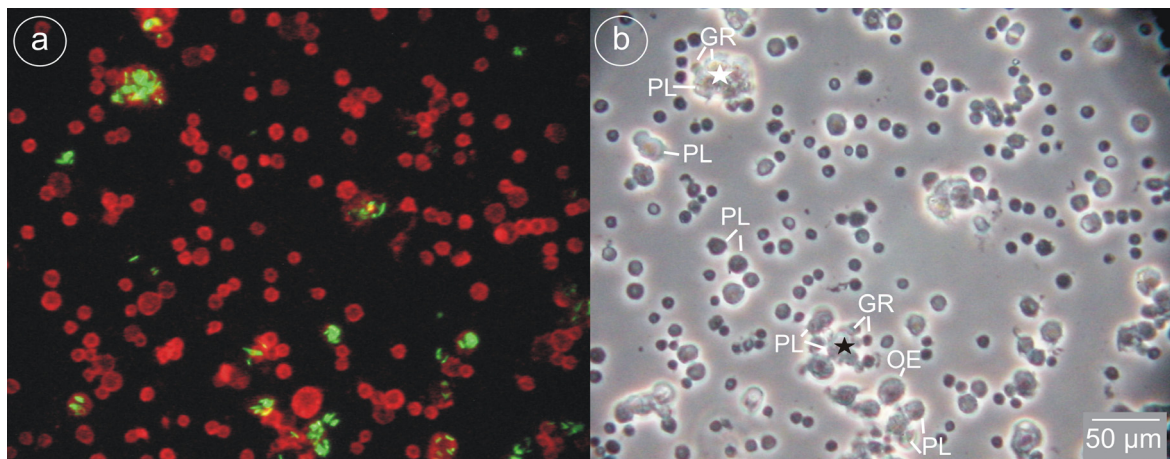
Abkürzungen: + nachweisbar, (+) schwach nachweisbar, ((+)) kaum nachweisbar,  
 - nicht nachweisbar, Hz Hämozyten, +\* bei einem einzelnen Tier nachweisbar,  
<sup>1)</sup> Frischzellpräparat

Es wurden je nach Bakterienart und Zeitpunkt 1–3 Larven ausgewertet (Rohdaten auf der in der AG Prof. Dr. T. Trenczek hinterlegten CD-ROM)

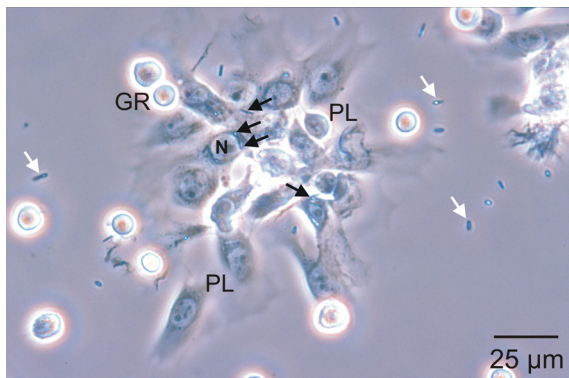




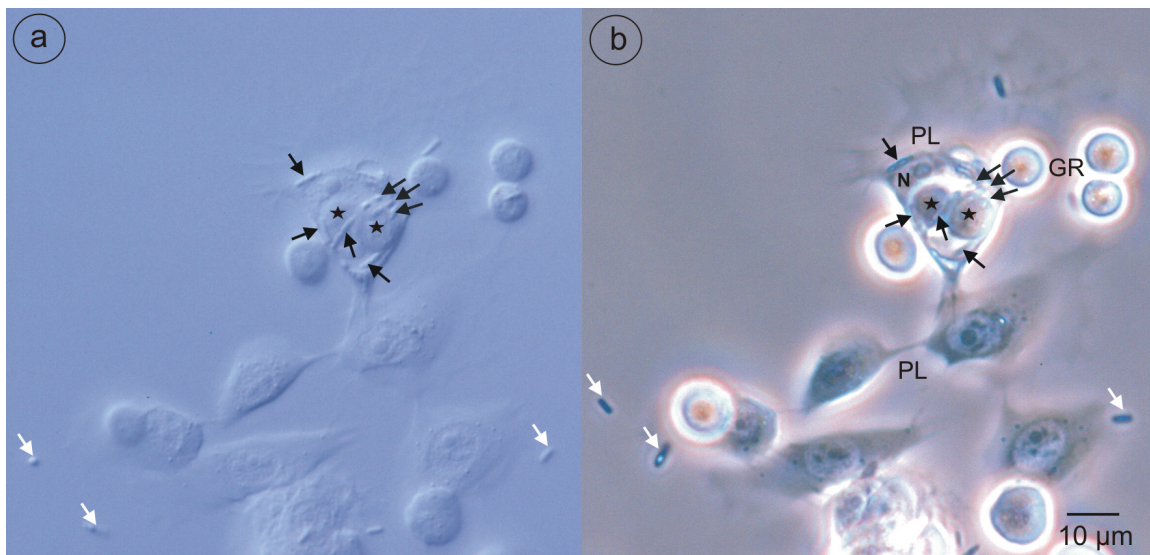
**Abb. 8 a – d:** Nachweis von *B. megaterium* 1 h p.i. in Hämözyten-Monolayern aus *M. sexta* L5d2-3. **a.** FITC-markierte *B. megaterium*; **b.** Markierung der Plasmatozyten (PL) mit MS#13 und indirekter Immunfluoreszenz (TRITC-konjugiert). **a.** und **b.** Fluoreszenzaufnahmen; **c.** Differenzialinterferenzkontrastaufnahme; **d.** Phasenkontrastaufnahme, Granuläre Zellen (GR)



**Abb. 9 a und b:** Nachweis von *B. megaterium* 5 h p.i. auf Hämözyten-Monolayern aus *M. sexta* L5d2-3. Bakterien sind einzeln oder zu mehreren mit Plasmatozyten (PL) assoziiert, die auch zusammen mit Granulären Zellen (GR) Hämözyten-Aggregate bilden können. An dem mit weißem Stern gekennzeichneten Aggregat sind viele Bakterien, an anderen (schwarzer Stern) nur wenige Bakterien beteiligt. Oenozytoide (OE) sind offenbar nicht mit Bakterien assoziiert. **a.** FITC-markierte *B. megaterium* und mit MS#02 und indirekter Immunfluoreszenz (TRITC-konjugiert) markierte Granuläre Zellen und Oenozytoide. **a.** Fluoreszenzaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme

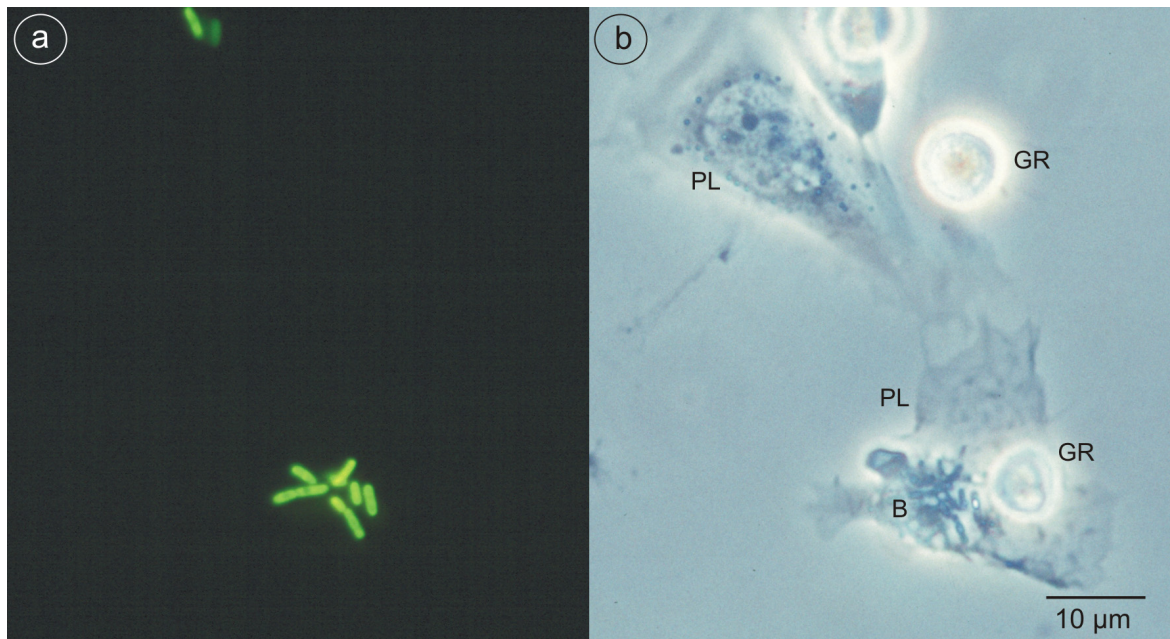


**Abb. 10:** Hämocyten-Frischzellpräparat aus *M. sexta* L5d2 (5 h p. i. mit *B. megaterium*). An der Bildung des Zellaggregats sind v. a. Plasmatocyten (PL) aber auch Granuläre Zellen (GR) beteiligt. Weiße Pfeile zeigen auf einige freie Bakterien, schwarze Pfeile zeigen auf bereits mit dem Hämocyten-Aggregat assoziierte oder sogar phagozytierte Bakterien, einige davon offenbar im Zytoplasma von Plasmatozyten nah um den Zellkern (N). Phasenkontrastaufnahme

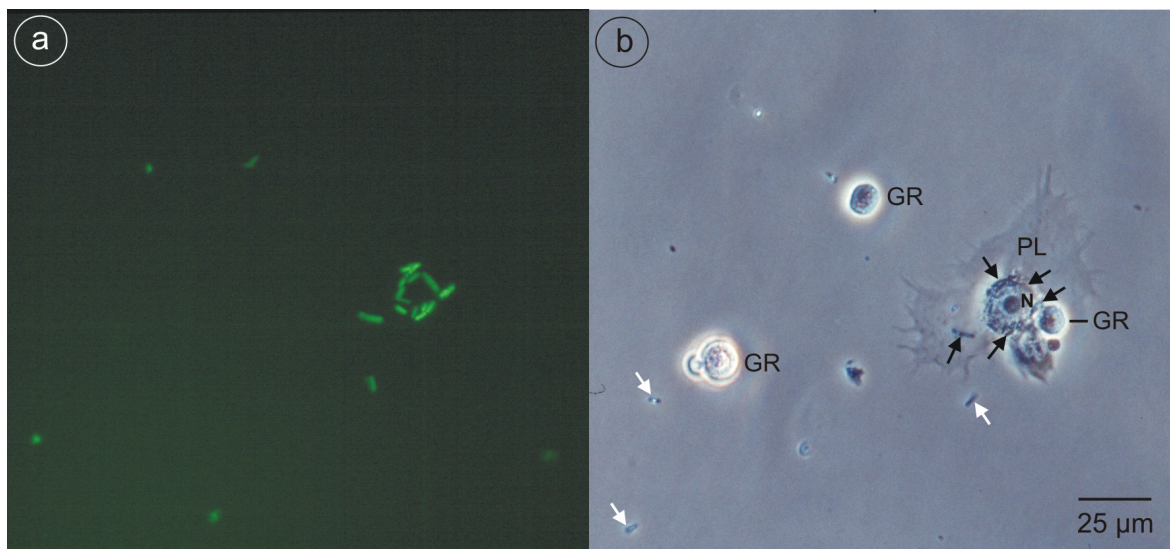


**Abb. 11 a und b:** Hämocyten-Frischzellpräparat aus *M. sexta* L5d2 (5 h p. i. mit *B. megaterium*). Kleines Aggregat aus Plasmatocyten (PL) und Granulären Zellen (GR); weiße Pfeile deuten auf freie Bakterien hin, schwarze auf Bakterien, die mit dem Hämocyten-Aggregat assoziiert sind oder von Hämocyten phagozytiert wurden. Solche Bakterien sind im Zytoplasma der Plasmatocyte um den Zellkern (N) angeordnet. Evtl. wurden auch zwei Granuläre Zellen (Sterne) von einer oder mehreren Plasmatocyten aufgenommen. Die Tatsache, dass manche der freien Bakterien in **a.** und **b.** nicht an der gleichen Stelle liegen, ist auf Brown'sche Molekularbewegung während der Zeit zwischen den beiden Fotografien zurückzuführen. **a.** Differenzialinterferenzkontrastaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme

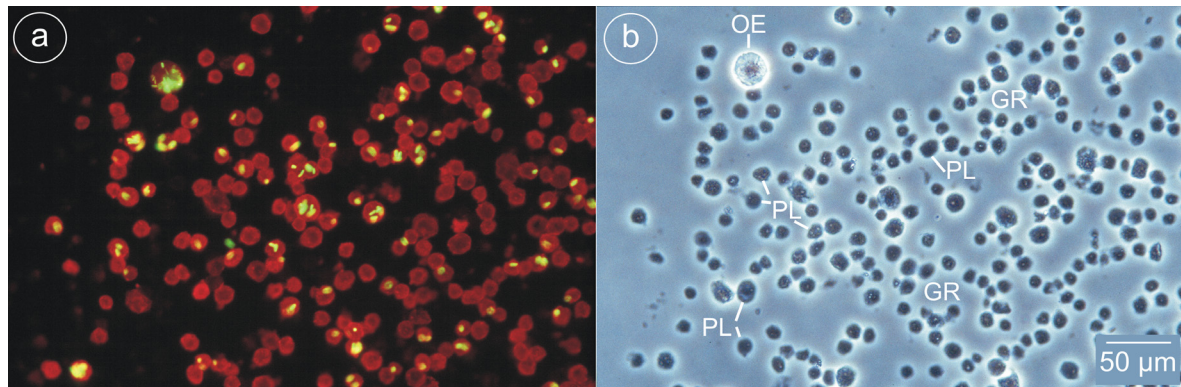




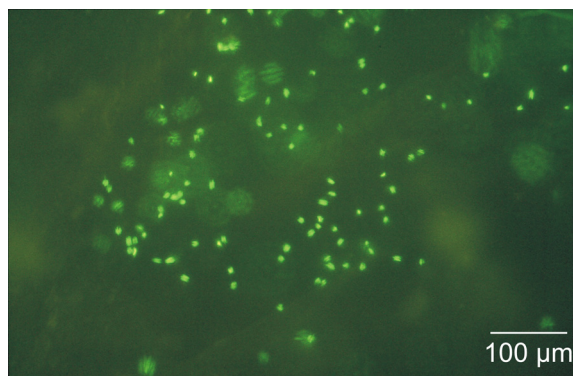
**Abb. 12 a und b:** Hämozyten-Frischzellpräparat aus *M. sexta* L5d2 (5 h p. i. mit FITC-markierten *B. megaterium*). An die untere Plasmatozyte (PL) sind sowohl eine Granuläre Zelle (GR) als auch Bakterien (B) angelagert oder sie wurden von ihr bereits aufgenommen. **a.** Fluoreszenzaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme



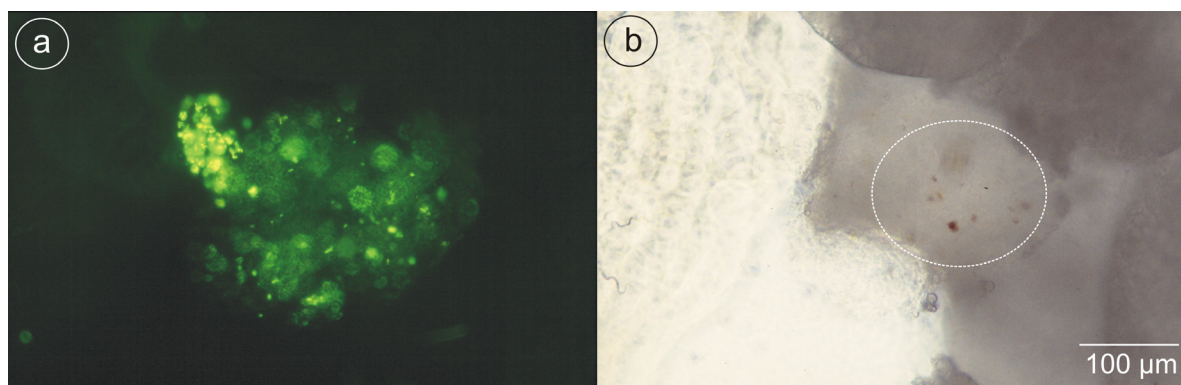
**Abb. 13 a und b:** Hämozyten-Frischzellpräparat aus *M. sexta* L5d2 (5 h p. i. mit FITC-markierten *B. megaterium*). **a.** FITC-markierte *B. megaterium*. **b.** Um den Zellkern (N) mit großem Nukleolus der Plasmatozyte (PL) herum befinden sich vermutlich phagozytierte Bakterien (schwarze Pfeile). Auch eine Granuläre Zelle (GR) ist an die Plasmatozyte angelagert. Außerdem liegen noch freie Bakterien (weiße Pfeile) neben den Hämozyten vor. Die Tatsache, dass manche der freien Bakterien in **a.** und **b.** nicht an der gleichen Stelle liegen, ist auf Brown'sche Molekularbewegung während der Zeit zwischen den beiden Fotografien zurückzuführen. **a.** Fluoreszenzaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme



**Abb. 14 a und b:** Nachweis von *B. megaterium* (24 h p. i. mit) auf Hämazyten-Monolayern aus *M. sexta* L5d2–3. Bakterien liegen jetzt auch assoziiert mit einzelnen Granulären Zellen (GR) vor, nur noch wenige Plasmatozyten (PL) weisen Bakterien auf. Vereinzelt finden sich auch Oenozoitoide (OE, hier zerfallend) zusammen mit Clustern von Bakterien. **a.** FITC-markierte *B. megaterium* und mit MS#02 und indirekter Immunfluoreszenz (TRITC-konjugiert) markierte Granuläre Zellen und Oenozoitoide (Fluoreszenzaufnahme); **b.** Phasenkontrastaufnahme

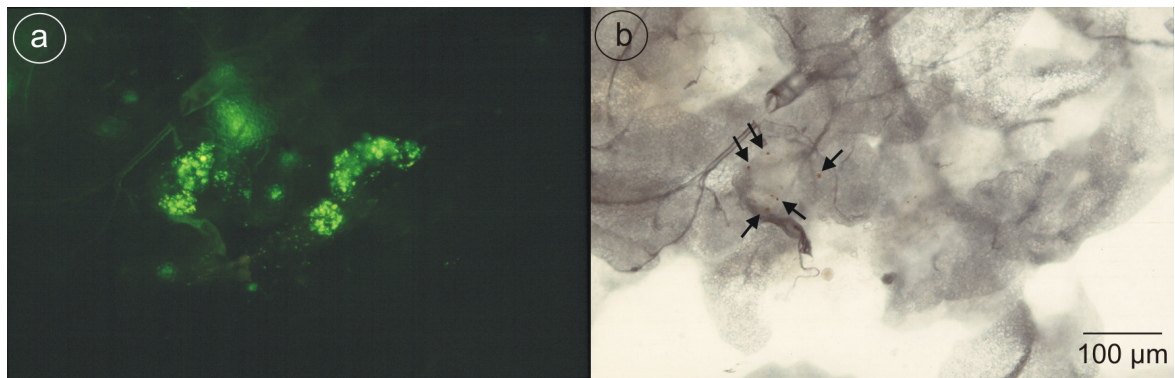


**Abb. 15:** Frischpräparat des Fettkörpers einer *M. sexta* L5d2–3 mit FITC-markierten *B. megaterium* (1 h p. i.). Die Bakterien liegen weit über den Fettkörper verteilt. (Fluoreszenzaufnahme)

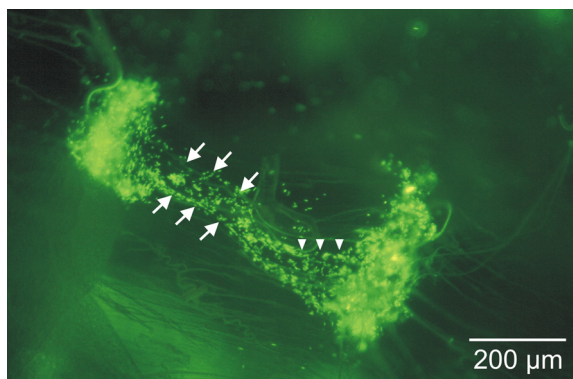


**Abb. 16:** Frischpräparat des Fettkörpers einer *M. sexta* L5d2–3 mit FITC-markierten *B. megaterium* (5 h p. i.). Die Bakterien liegen in größeren Clustern auf dem Fettkörper, der in diesem Bereich Melanisierungs-Flecken aufweist (gekennzeichneter Bereich in **b**). **a.** Fluoreszenzaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme





**Abb. 17 a und b:** Frischpräparat des Fettkörpers einer *M. sexta* L5d2-3 mit FITC-markierten *B. megaterium* (24 h p. i.). **a.** Die Bakterien scheinen noch etwas „konzentrierter“ vorzuliegen als 5 h p. i. **b.** Dort, wo sich Bakterien befinden, fallen braune Melanisierungsspot auf (schwarze Pfeile). **a.** Fluoreszenzaufnahme; **b.** Phasenkontrastaufnahme



**Abb. 18:** Frischzellpräparat der Integument-Innenseite in der Nähe der Injektionsstelle von *M. sexta* L5d2-3 mit FITC-markierten *B. megaterium* (3 h p. i.). Die Bakterien scheinen nicht nur als Cluster vorzuliegen, sondern sich auch entlang von Tracheen (eingefasst von Pfeilen) und anderen „Fasern“ (Pfeilköpfe) anzusammeln. (Fluoreszenzaufnahme)

### **3.2.2 Nachweis der Phagozytose von *B. megaterium* durch Hämozyten von *M. sexta*-Larven**

Da lichtmikroskopisch (Phasenkontrast, Differenzialinterferenzkontrast) bzw. fluoreszenzmikroskopisch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob die in *M. sexta*-Larven injizierten Bakterien tatsächlich von den Hämozytentypen phagozytiert worden oder ob sie nur an sie angelagert waren, wurde dies im Folgenden mit weiteren Verfahren (Quenching, Transmissionselektronenmikroskopie) untersucht.

#### **3.2.2.1 Quenching mittels Trypanblau resp. Propidiumjodid**

Mit Hilfe der Quenching-Methode (nach HED 1986) sollte die Fluoreszenz freier, nicht phagozytierter FITC-markierter Bakterien mittels Trypanblau bzw. Propidiumjodid überdeckt werden, um sie so von Bakterien zu unterscheiden, die von Hämozyten phagozytiert wurden (Fluoreszenz noch vorhanden). Das Quenching war jedoch bei keiner der verwendeten Trypanblau-Konzentrationen (0,2–5 % w/v) erfolgreich, d. h. die Fluoreszenz der FITC-markierten *B. megaterium* ließ sich mit Trypanblau nicht in ausreichendem Maße abschwächen.

Auch bei der Verwendung von Propidiumjodid (1 % w/v) zeigte sich nur ein mäßiger Abschwächungseffekt, der mit starker Hintergrund-Färbung verbunden war und keine eindeutige Aussage darüber zuließ, ob die Bakterien von Hämozyten ingestiert worden waren oder nicht.

#### **3.2.2.2 Nachweis der Phagozytose von *B. megaterium* durch Hämozyten von *M. sexta* mittels Transmissionselektronenmikroskopie**

Mittels der Transmissionselektronenmikroskopie wurden Hämozyten-Präparate von *M. sexta* Larven (L5d3) untersucht, die 5 h bzw. 24 h nach der Infektion der Larven mit *B. megaterium* gewonnen worden waren, im Vergleich zu Präparaten von unbehandelten Larven.

Zunächst werden hier einzelne Hämozytentypen vorgestellt, die aufgrund der Auswertung der lichtmikroskopischen Untersuchungen (Kap. 3.2.1) unter Umständen in die Phagozytose bzw. die Entfernung der Bakterien aus der

Hämolymphe involviert sein könnten. Danach werden die beobachteten Phänomene gezeigt.

Das injizierte stäbchenförmige Bakterium *B. megaterium* lag überwiegend in Form von vegetativen Zellen vor (z. B. Abb. 25). Vereinzelt war es jedoch auch bereits sporuliert (Abb. 19).

In den Übersichtsbildern (Abb. 20) mit den drei aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen für die Phagozytose in Frage kommenden Hämozytentypen (Sphärule Zellen und Prohämozyten sind hier nicht explizit dargestellt) sind deutlich die unterschiedlichen Formen, Größen und Ultrastrukturen von Plasmatozyten, Granulären Zellen und Oenozytoiden zu erkennen.

Bei genauerer Betrachtung der Hämozyten lassen sich folgende Charakteristika hervorheben:

Die Plasmatozyten (Abb. 21) erscheinen meist als lang gestreckte spindelförmige Zellen, die Pseudopodien ausbilden. Der ausgedehnte gelappte Zellkern mit großem elektronendichtem Nukleolus ist für sie charakteristisch.

Granuläre Zellen (Abb. 22) sind kleiner als Plasmatozyten und haben eine rundliche Gestalt. Auch ihr Zellkern ist rund und relativ klein im Verhältnis zum Zytoplasma. Sie zeichnen sich durch Granulen im Zytoplasma aus, deren Inhalt sie entleeren können (Abb. 22 d). Außerdem fällt das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) auf, das zisternenartig erweitert sein kann. Die Granulären Zellen können auch Mikrospikes aufweisen (Abb. 22 b).

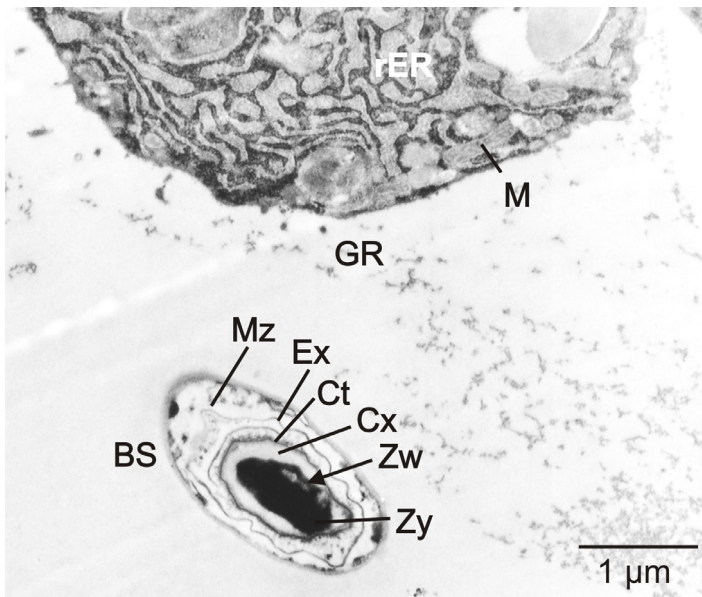
Oenozytoide (Abb. 23) sind die größten unter den hier vorliegenden Zellen. Die Ultrastruktur ihres Zytoplasmas ist einheitlicher als die der anderen Hämozytentypen, viele freie Ribosomen sind neben Mitochondrien im gesamten Zytoplasma verteilt. Der Zellkern ist eher klein im Vergleich zur Gesamtgröße der Zelle.

Bezüglich der Frage, welche Hämozytentypen in die Phagozytose von *B. megaterium* involviert sind bzw. ob eine solche überhaupt stattfindet, lassen sich folgende Aussagen treffen: Es traten sowohl größere (Abb. 24) als auch kleinere (Abb. 25) Aggregate aus Hämozyten, Bakterien und koagulierte Material auf. Bei kleineren Ansammlungen (Abb. 25) aus nur wenigen Hämozyten wurde deutlich, dass meist ein oder zwei Plasmatozyten andere Plasmatozyten oder Granuläre Zellen und Bakterien mit ihren Pseudopodien „umflossen“ und so die Bakterien eingeschlossen hatten (Abb. 25 b). An solch kleinere Zell-Aggregate

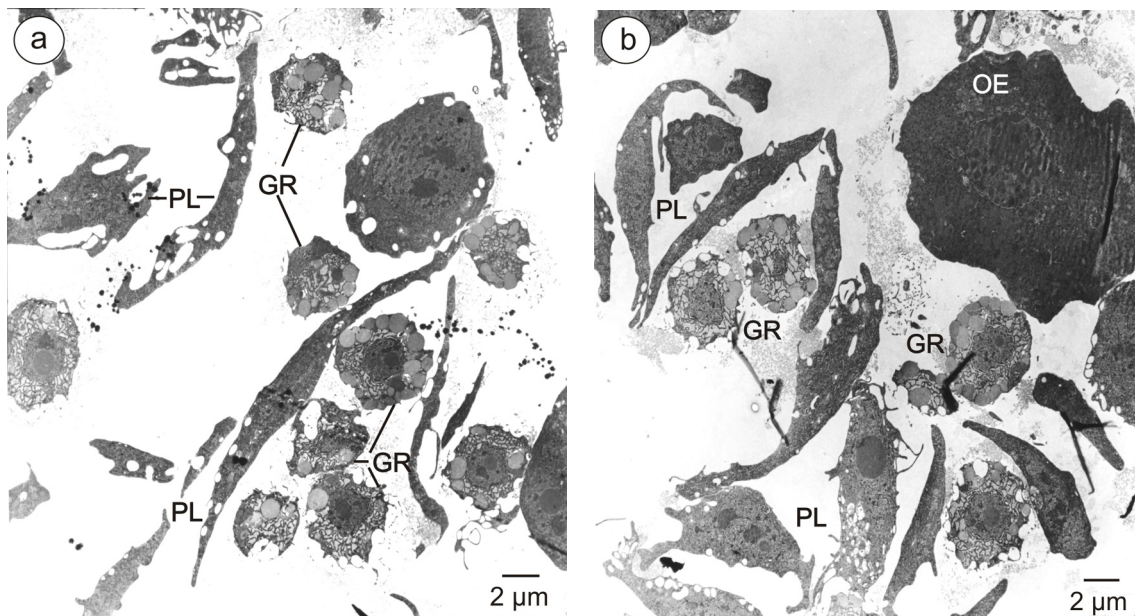
konnten sich wiederum andere Granuläre Zellen oder Plasmatozyten anlagern, so dass das Aggregat schichtartig wuchs (Abb. 25 a). An derartigen Aggregaten waren überwiegend Plasmatozyten, aber auch Granuläre Zellen beteiligt. In einem Fall (Abb. 25 a) könnte ein Oenozytoid beteiligt gewesen sein. Jedoch war die Bestimmung der Hämozyte hier schwierig. Die Struktur des Zytoplasmas sprach zwar für eine Identifizierung als Oenozytoid, die granulenartigen Strukturen jedoch für eine Granuläre Zelle.

Größere und kleinere Aggregate aus Hämozyten und Bakterien traten sowohl 5 h als auch 24 h p. i. auf. Außerdem konnten zu beiden Zeitpunkten sowohl Plasmatozyten als auch Granuläre Zellen nachgewiesen werden, die *B. megaterium*-Zellen enthielten (5 h p. i. siehe Abb. 25 für PL und GR, 24 h p. i. siehe Abb. 26 für GR, für PL hier nicht gezeigt). Oenozytoide, die Bakterien phagozytiert hatten, wurden nicht entdeckt. Darüber hinaus schienen Oenozytoide nicht an der Aggregatbildung beteiligt zu sein.

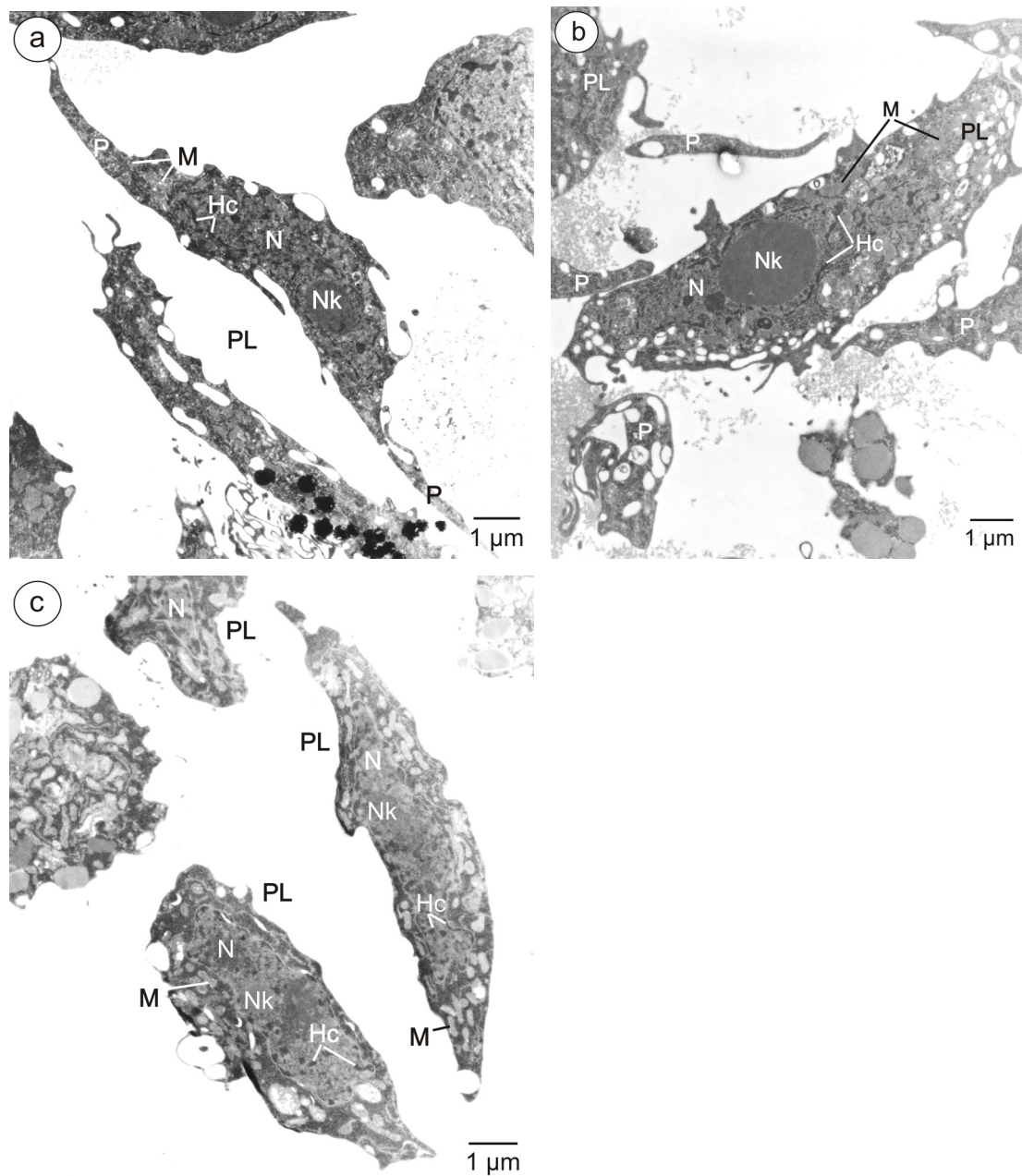




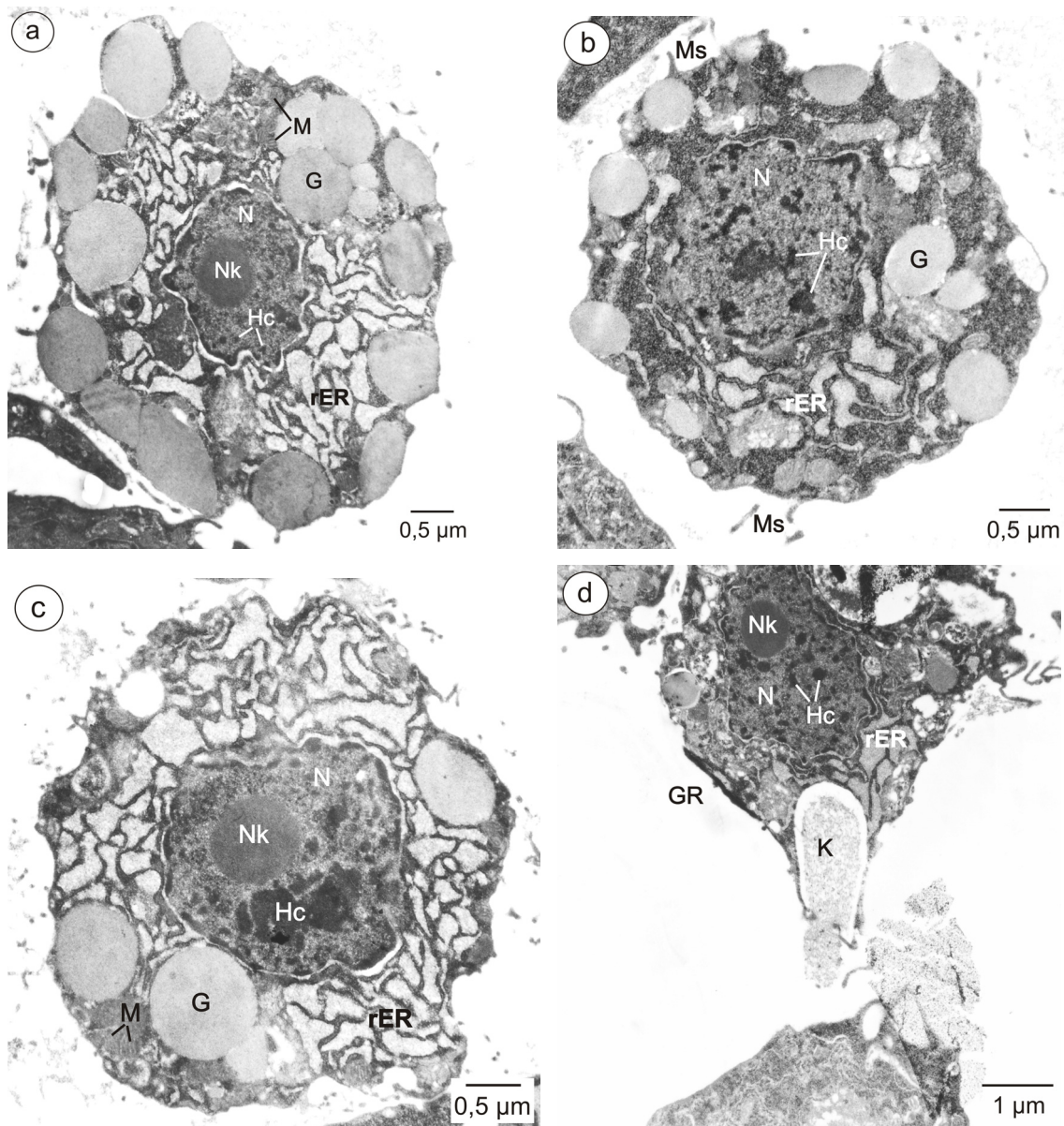
**Abb. 19:** Ultrastruktur einer Bakterienspore: Vorspore (BS) im Stadium V-VI (nach STRAGIER & LOSICK, 1996) von *B. megaterium* in der Hämolymphe von *M. sexta* L5d3 (5 h p. i.). Der eigentliche Sporenprotoplast bestehend aus Zellwand (Zw) und Zytoplasma (Zy) und die ihn umgebenden Schichten aus Cortex (Cx; Sporenrinde), Coat (Ct, Sporenhülle) und Exosporium (Ex) befindet sich noch in der Mutterzelle (Mz). Oben im Bild ist eine Granuläre Zelle (GR) angeschnitten, bei der das dilatierte raue Endoplasmatische Retikulum (rER) sowie einige Mitochondrien (M) deutlich zu erkennen sind.



**Abb. 20 a und b:** Übersichtsbilder (TEM) mit verschiedenen Hämocytyentypen von *M. sexta* L5d3 (ub): Granuläre Zellen (GR), Plasmatozyten (PL), Oenozytoide (OE).

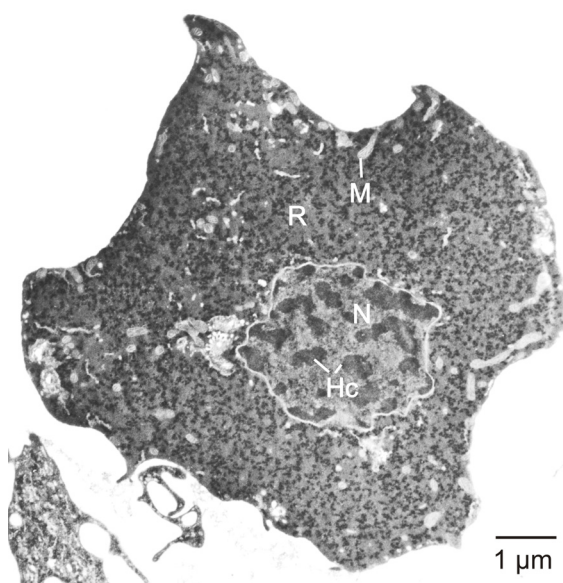


**Abb. 21 a – c:** Ultrastruktur spindelförmiger Plasmatozyten (PL) von *M. sexta* L5d3: gelappter Zellkern (N), Nukleolus (Nk), Heterochromatin (Hc), Mitochondrien (M), Pseudopodien (P). **a.** und **b.:** ub; **c:** 24 h p. i. mit *B. megaterium*

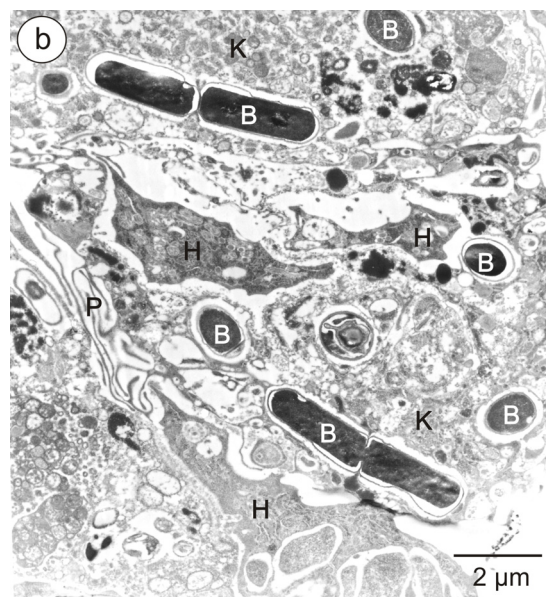
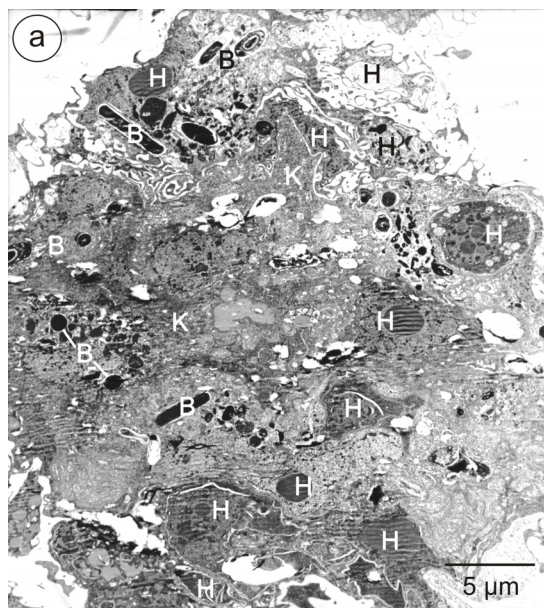


**Abb. 22 a – d:** a. – c. Ultrastruktur Granulärer Zellen von *M. sexta* L5d3 (ub): Zellkern (N) mit Nukleolus (Nk in a. und c.) und Heterochromatin (Hc), raues Endoplasmatisches Retikulum (rER), Granulen (G), Mitochondrien (M), Mikrospikes (Ms in b.). d. Aus einer Granule einer Granulären Zelle (GR) tritt der Granulen-Inhalt (K) aus.

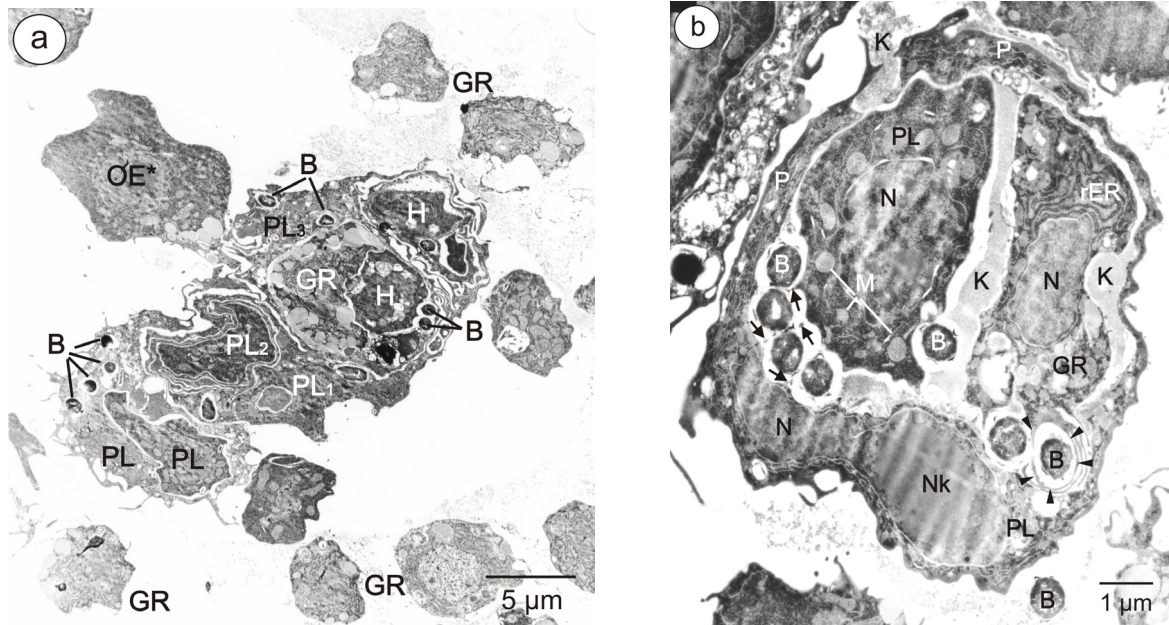




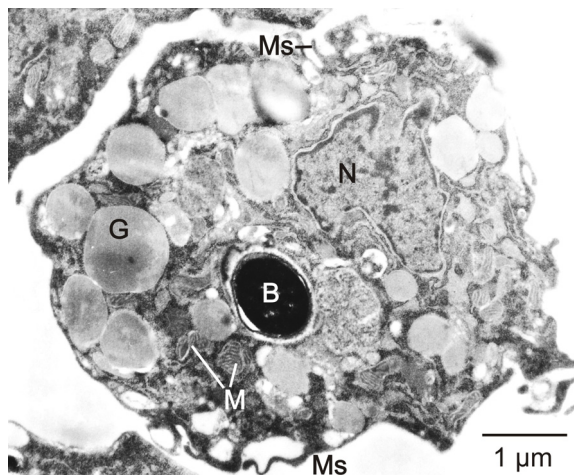
**Abb. 23:** Ultrastruktur eines Oenozytoids von *M. sexta* L5d3 (ub): Mitochondrien (M), freie Ribosomen (R), Zellkern (N), kondensiertes Chromatin (Hc)



**Abb. 24 a und b:** Ultrastruktur eines großen Aggregats aus Hämozyten (H), Bakterien (B) und Koagulum (K) in der Hämolymphe von *M. sexta* L5d3 (24 h p. i. mit *B. megaterium*). *B. megaterium*-Zellen sind sowohl längs als auch quer angeschnitten. Plasmatozyten, die an einem solchen Aggregat beteiligt sind, können dabei sehr lange verschlungene Pseudopodien (P in **b**.) ausbilden.



**Abb. 25 a und b:** Ultrastruktur kleinerer Aggregate aus Hämozyten, Bakterien und Koagulum in der Hämolymphe von *M. sexta* L5d3 (5 h p. i. mit *B. megaterium*). **a.** Mindestens fünf Plasmatozyten (PL), eine Granuläre Zelle (GR) sowie zwei weitere nicht identifizierte Hämozyten (H) sind an dem Aggregat beteiligt. Mit ihren Pseudopodien "umfließen" die Hämozyten einander und schließen dabei auch Bakterien (B) mit ein. Z. B. umschließt PL<sub>1</sub> PL<sub>2</sub> vollständig, während die Granuläre Zelle und die beiden nicht identifizierten Hämozyten sowohl von PL<sub>1</sub> als auch von PL<sub>3</sub> eingefasst werden. Letztere beinhaltet zudem zwei Bakterienzellen. Ob es sich bei der mit OE\* gekennzeichneten Hämozyte tatsächlich um einen Oenozytoid handelt, ist unklar. **b.** Das Aggregat besteht aus einer Granulären Zelle und zwei Plasmatozyten, von denen eine mit ihren Pseudopodien (P) die anderen beiden Zellen vollständig umgreift und dabei auch Bakterien und Koagulum (K) einschließt. Auch die Granuläre Zelle selbst hat mindestens ein Bakterium aufgenommen (Pfeilköpfe). Bei den Plasmatozyten könnte dies auch der Fall sein (Pfeile), die Zellmembran ist in diesem Schnitt jedoch nicht vollständig getroffen.



**Abb. 26:** Ultrastruktur einer Granulären Zelle aus der Hämolymphe von *M. sexta* (24 h p. i. mit *B. megaterium*). Zellkern (N), Granulen (G), Mitochondrien (M) und *B. megaterium* Zelle (B). Die Granuläre Zelle hat Mikrospeikes (Ms) ausgebildet.

### 3.3 Nachweis potenzieller Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien in der Hämolymphe von *M. sexta*

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass die Phagozytose von Bakterien durch Hämozyten mittels Rezeptoren in der Hämozytenmembran geschieht, wurde versucht, das entsprechende Bindeprotein zu identifizieren. Dabei kann die Aufnahme der Bakterien durch die Hämozyten mittels zweier Prozesse ermöglicht werden: Das Bakterium bindet direkt an einen Rezeptor für Oberflächenstrukturen von Bakterien in der Hämozytenmembran oder aber an ein Plasmaprotein. Im zweiten Fall würde die Phagozytose durch die Bindung des Bakterien-Bindungsprotein-Komplexes an einen Rezeptor in der Membran ermöglicht. Da Hinweise aus der Literatur für die zweite Möglichkeit sprachen, z. B. das Lipopolysaccharide(LPS)-bindende Protein und das *peptidoglycan recognition protein* von *B. mori* (KOIZUMI et al. 1997, YOSHIDA et al. 1996), wurde versucht, ein Bindungsprotein im Plasma zu identifizieren.

#### 3.3.1 Problematik von *M. luteus* als Affinitätsmatrix

Für die Identifizierung und Isolierung eines potenziellen Bindungsproteins für Gram-positive Bakterien im Hämolymp plasma von *M. sexta* wurde das Affinitätspräzipitations-Verfahren mit *M. luteus* als Matrix gewählt. Der Einsatz von *M. luteus* als Affinitätsmatrix erwies sich jedoch als ungeeignet. Während der Inkubation der *M. luteus*-Matrix mit dem Hämolymp plasma verringerte sich das Bakterienpellet deutlich.

Der Verdacht lag nahe, dass bereits die im Plasma vorhandene Lysozymmenge für die Auflösung der *M. luteus*-Zellen verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde in einem kleinen Test überprüft: Es stellte sich heraus, dass in einer *M. luteus*-Suspension, die mit einer Hühnereiweiß-Lysozym-Lösung inkubiert wurde, die optische Dichte (OD) innerhalb weniger Sekunden bis Minuten stark abnahm.

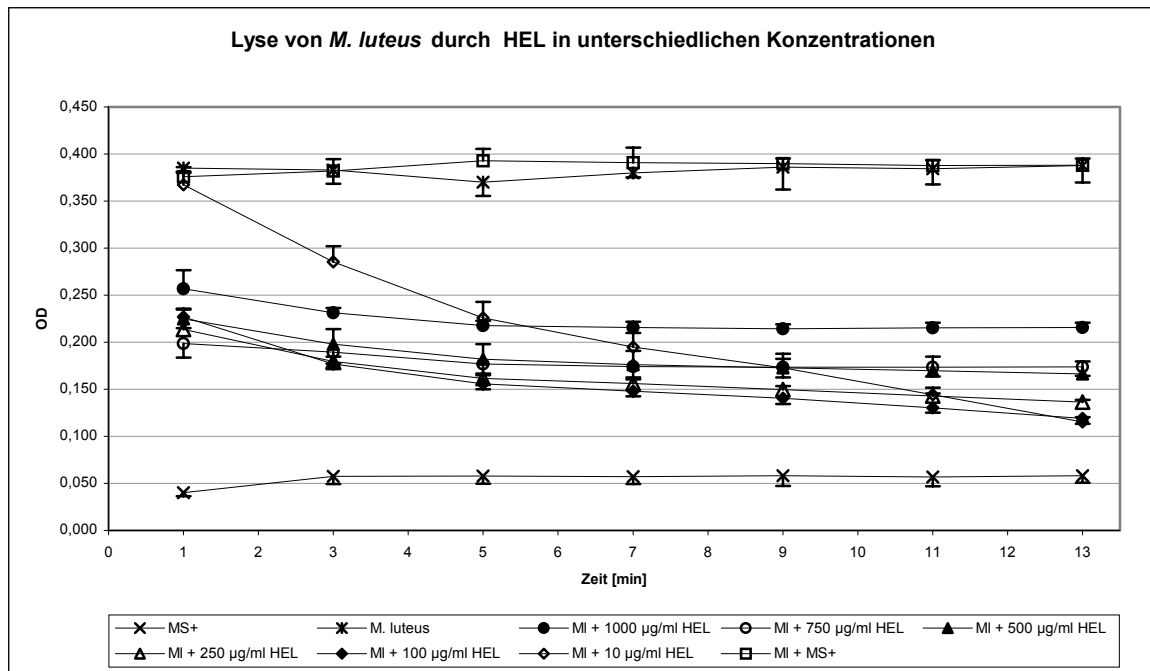
Eine direkte Simulation des Ablaufs im Tier (Injektion von 50 µl *M. luteus*-Suspension mit  $c = 0,2 \text{ mg/ml}$ ) bei geschätzten 1–2 ml Hämolymphe pro Larve (L5d2–4) erwies sich als nicht möglich, da die grüne Farbe der Hämolymphe die nur geringe Trübung durch *M. luteus* unmessbar machte. Deshalb wurde ein *in-*

*vitro*-Assay im Mikrotiterplatten-Maßstab mit Hühnereiweiß-Lysozym statt mit Hämolymphe durchgeführt.

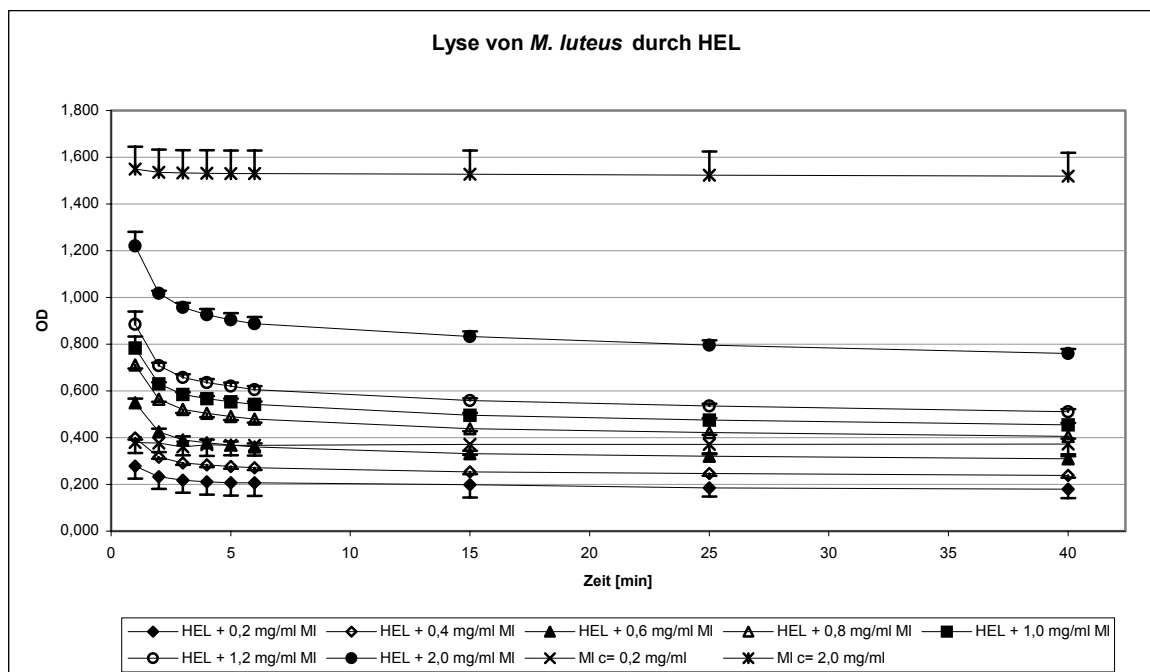
Zunächst wurde bei gleichbleibender *M. luteus*-Konzentration ( $c = 0,2 \text{ mg/ml}$ ) mit verschiedenen HEL-Konzentrationen gearbeitet. Innerhalb des Messzeitraums von 13 min war eine deutliche Abnahme der OD zu erkennen. Bei hohen HEL-Konzentrationen war sie jedoch geringer als bei niedrigen, wobei die OD bei hohen HEL-Konzentrationen grundsätzlich höher lag als bei niedrigen (Abb. 27). Die stärkste Abnahme der OD zeigte sich bei Zugabe von  $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$  HEL zu  $0,2 \text{ mg/ml}$  *M. luteus*. Außerdem wurde deutlich, dass die stärkste Abnahme in den ersten fünf Minuten der Inkubation stattfand.

In einer weiteren Messreihe wurde bei gleichbleibender HEL-Konzentration ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) die *M. luteus*-Konzentration verändert. Als Orientierungswert diente dabei die durchschnittliche Lyseaktivität unbehandelter L5d2-4 Larven ( $n = 20$ ) von  $c = 557 \text{ } \mu\text{g/ml}$  mit Werten zwischen  $c = 323 \text{ } \mu\text{g/ml}$  und  $c = 1,027 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Darüber hinaus wurde auch mit höheren *M. luteus*-Konzentrationen gearbeitet, da dann die Veränderung der OD besser messbar war.

Es wurde deutlich, dass *M. luteus* innerhalb der ersten fünf Inkubationsminuten lysiert wird (Abb. 28). Es ist noch auf Folgendes hinzuweisen: Die Messung konnte aufgrund der technischen Voraussetzungen frühestens 1 min nach Beginn der Inkubation erfolgen. Der erste Messwert der Testkurve mit HEL entspricht also nicht dem Anfangswert. Wie die Kontroll-Messungen für die Inkubation von *M. luteus* ohne HEL zeigten, veränderte sich die *M. luteus*-Konzentration über den gesamten Messzeitraum nur minimal (vermutlich durch das Absinken der Partikel). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Werte auch die Anfangswerte für die Test-Kurve „HEL +  $2,0 \text{ mg/ml}$  MI“ darstellen. Daraus kann geschlossen werden, dass die „stärkste“ Lyse sogar innerhalb der ersten zwei Minuten stattfand.



**Abb. 27:** Zeitlicher Verlauf der Lyse von *M. luteus* durch HEL. Einsatz von HEL in unterschiedlichen Konzentrationen, *M. luteus*-Konzentration  $c = 0,2$  mg/ml. Die Messung erfolgte in je 3 Parallelansätzen. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einfach dargestellt. HEL = Hühnereiweiß-Lysozym, MI = *M. luteus*, MS+ = Vollsaline, OD = optische Dichte



**Abb. 28:** Zeitlicher Verlauf der Lyse von *M. luteus* durch HEL. Einsatz von *M. luteus* in unterschiedlichen Konzentrationen, HEL-Konzentration  $c = 0,5$  mg/ml. Die Messung erfolgte in je 4 Parallelansätzen. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einfach dargestellt. Abkürzungen siehe Abb. 27.



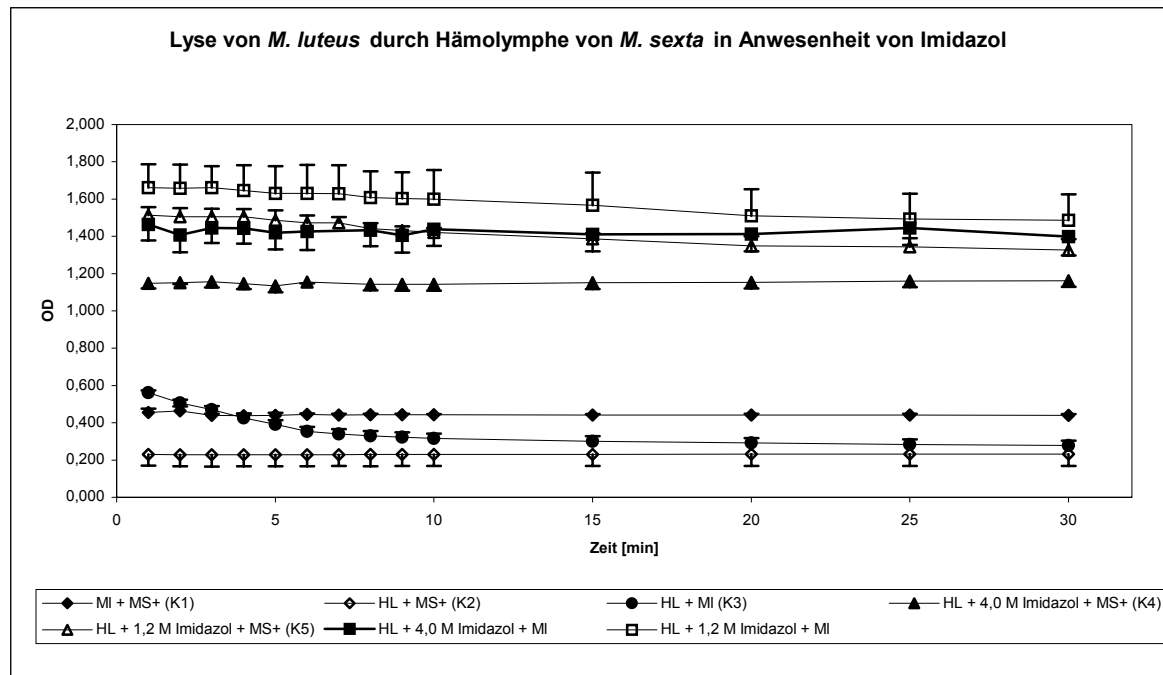
Die Versuche ergaben somit, dass *M. luteus* als Affinitätsmatrix für die Affinitätspräzipitation unter den gegebenen Bedingungen ungeeignet war. Dies Offenbar reichte schon die durchschnittliche Lysozymkonzentration in der Hämolymphe unbehandelter L5-Larven aus, um *M. luteus* in kürzester Zeit zu lysieren, so dass eine korrekte Versuchsdurchführung nicht mehr gewährleistet war. Es musste nun entweder die Lyse von *M. luteus* verhindert bzw. gehemmt werden oder ein anderes, weniger lysozymempfindliches Bakterium für die Untersuchung gewählt werden.

### **3.3.2 Hemmung des Lysozym-Verdaus von *M. luteus* durch Imidazol bzw. Histamin**

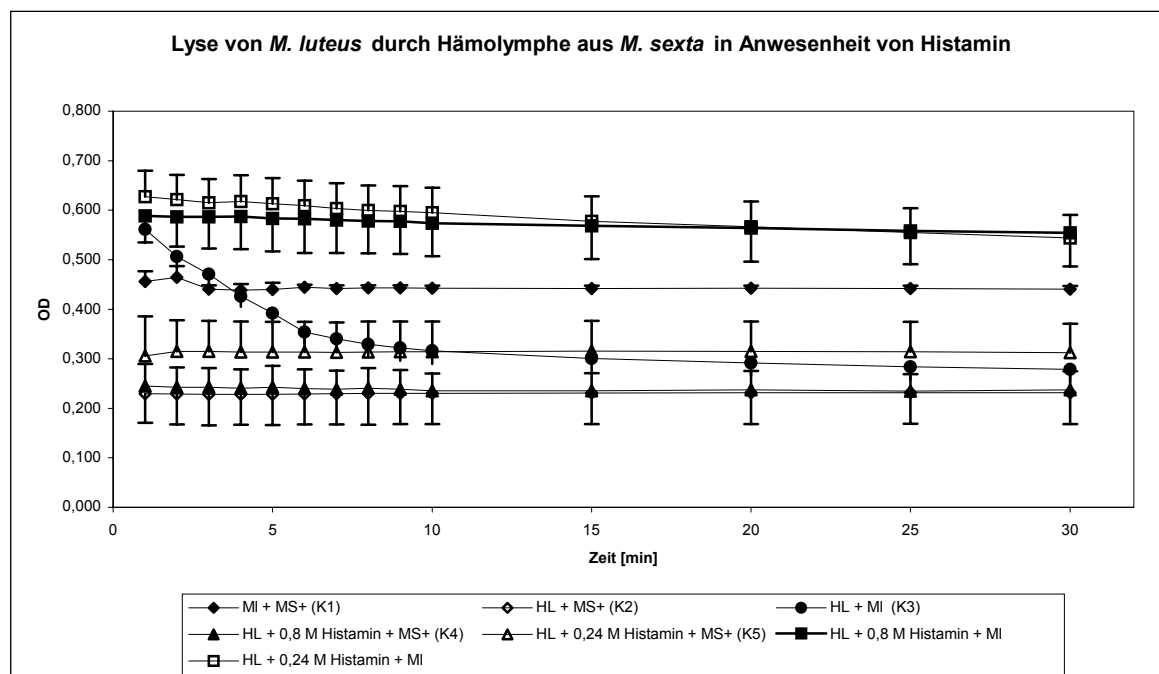
Um die Lyse der *M. luteus*-Matrix bei der Affinitätspräzipitation zu verhindern, wurde zunächst versucht, den Lysozym-Verdau von *M. luteus* zu hemmen. Dazu wurden zwei verschiedene Substanzen eingesetzt: Imidazol und Histamin (Histamindihydrochlorid).

Zuerst wurden im *in-vitro*-Assay (Mikrotiterplatten-Maßstab) verschiedene Inkubationszeiten und unterschiedliche Konzentrationen der beiden Hemmsubstanzen getestet. Dabei wurde auch hier zunächst mit einer HEL-Lösung ( $c_{HEL} = 15 \mu\text{g/ml}$ ) gearbeitet und nicht mit (farbiger) Hämolymphe. Ausgehend von 0,4 M Imidazol bzw. 0,08 M Histamin (Angaben bei SHINITZKY et al. 1966) wurden die Konzentrationen der beiden Hemmsubstanzen schrittweise erhöht, bis Konzentrationen gefunden waren, die über einen Zeitraum von mindestens 30 min mit keiner Veränderung der OD verbunden waren. Dies war bei 4,0 M Imidazol bzw. 0,8 M Histamin der Fall.

Mit diesen Konzentrationen wurde die hemmende Wirkung von Imidazol und Histamin auf das in Hämolymphe von *M. sexta* vorhandene Lysozym getestet. Imidazol erwies sich in einer Konzentration von 4,0 M als geeignet für die Hemmung des Hämolymphe-Lysozyms (Abb. 29). Im Vergleich mit Histamin (Abb. 30), das bei einer Konzentration von 0,8 M ebenfalls eine gute Hemmung der Lyse aufwies, zeigte Imidazol alleine jedoch eine starke Zunahme der Basis-OD im Assay.



**Abb. 29:** Lyse von *M. luteus* durch *M. sexta*-Hämolymphe in Abhängigkeit von verschiedenen Imidazol-Konzentrationen. Die Messung erfolgte mit je 6 Parallelansätzen. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einfach dargestellt. HL = Hämolymphe 1:2 mit Vollsaline verdünnt, K1 bis K5 = Kontrollen, MI = *M. luteus*, MS+ = Vollsaline



**Abb. 30:** Lyse von *M. luteus* durch *M. sexta*-Hämolymphe in Abhängigkeit von verschiedenen Histamin-Konzentrationen. Die Messung erfolgte mit je 6 Parallelansätzen (Ausnahme: K4 mit  $n = 3$  und HL + 0,24 M Histamin + MI mit  $n = 4$ ). Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einfach dargestellt. Abkürzungen siehe Abb. 29.

### 3.3.3 Affinitätspräzipitation mit *M. luteus* als Matrix und Histamin als Hemmstoff

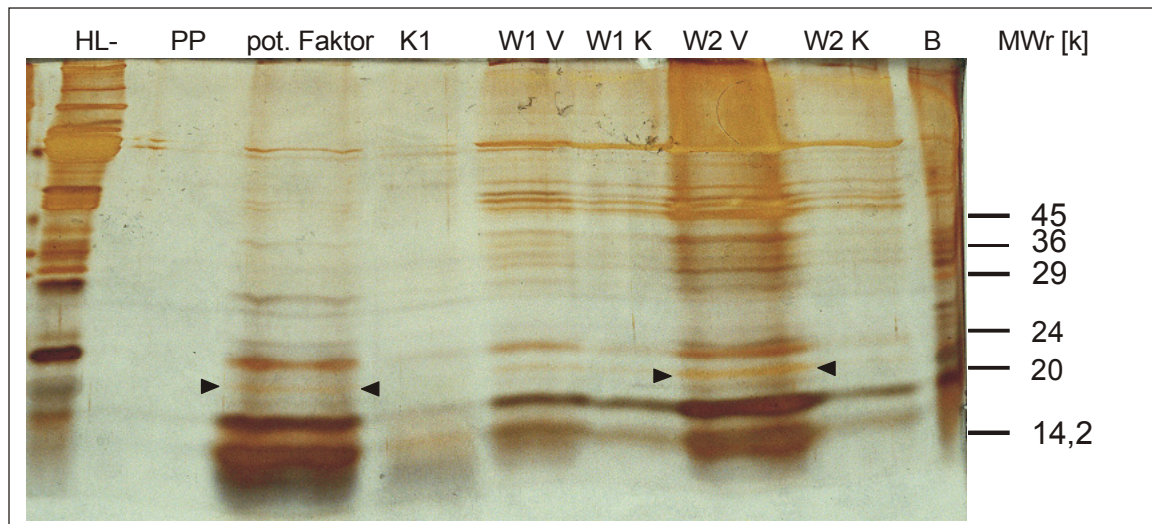
Auf den Ergebnissen der Hemmversuche aufbauend (Kap. 3.3.2) wurde bei der Affinitätspräzipitation mit *M. luteus* als Matrix den Ansätzen 0,8 M Histamin zugefügt. Histamin wurde Imidazol vorgezogen, weil hier eine geringere Menge der Hemmsubstanz nötig war als bei Verwendung von Imidazol.

Es stellte sich jedoch heraus, dass es während des Versuchsablaufs bei der Affinitätspräzipitation selbst bei dieser geringen Menge an Histamin bei einigen Versuchsschritten zum Ausfallen einer kristallinen Substanz kam, die den Versuchsablauf behinderte bzw. die Pellets sich nicht immer wieder lösen ließ. Darüber hinaus gelang die Hemmung des Abbaus der *M. luteus*-Matrix offenbar nicht ausreichend, so dass nach der elektrophoretischen Auftrennung einige Proben noch Spuren von *M. luteus*-Proteinen enthielten, die die potenziellen Hämolymp-Banden auf dem Gel überlagerten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Matrix-Material ausgewechselt. Es wurde ein anderes Gram-positives Bakterium, *Bacillus megaterium*, verwendet, das weniger empfindlich gegen Lysozym war.

### 3.3.4 Affinitätspräzipitation mit *B. megaterium* als Matrix

Bei dieser Affinitätspräzipitation zur Isolierung eines Bindungsfaktors für Gram-positive Bakterien aus der Hämolymphe von *M. sexta* wurden abgetötete *B. megaterium*-Zellen als Matrix eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Auch bei diesem Ansatz fand ein gewisser Abbau der Matrix statt. Er war im Vergleich mit der zuvor verwendeten *M. luteus*-Matrix aber deutlich geringer. Die Auswertung des Versuchs erfolgte mittels SDS-PAGE. Im Gel ist in Spur „pot. Faktor“ die Probe aufgetragen, in der ein potenzieller Bindungsfaktor für *B. megaterium* aus der Hämolymphe vermutet wurde (Abb. 31). Die in dieser Spur mit Pfeilköpfen gekennzeichnete Proteinbande im Bereich zwischen 15 und 20 kDa ist nur noch ein weiteres Mal in Spur „W2 V“ (2. Waschschrift des *B. megaterium* Pellets mit 0,5 M NaCl) vorhanden.



**Abb. 31:** Darstellung eines potenziellen Hämolympf-Bindungsfaktors an *B. megaterium*. Fraktionen einer Affinitätspräzipitation mit Hämolymphe von *M. sexta*-Larven und *B. megaterium* (siehe Kap. 2.2.11) wurden für die SDS-PAGE (12 % TG) aufgearbeitet und die Proteine mittels Silberfärbung nachgewiesen.

Beschriftung der Spuren:

**HL-** = Hämolymphe (ca. 0,15 µl) nach Inkubation mit der *B. megaterium*-Matrix und Desorption des potenziellen *B. megaterium*-bindenden Faktors,

**PP** = Probenpuffer,

**pot. Faktor** = Probe (ca. 20 µl), die den potenziellen *B. megaterium*-bindenden Faktor enthalten sollte,

**K1** = Kontroll-Probe (ca. 13 µl) im Vergleich zur Probe mit dem potenziellen *B. megaterium*-bindenden Faktor,

**W1 V** = Überstand (ca. 20 µl) nach dem Pelletieren der *B. megaterium*-Matrix,

**W1 K** = Kontrolle (ca. 20 µl) zu W1 V,

**W2 V** = Überstand (ca. 20 µl) nach dem Waschen mit NaCl,

**W2 K** = Kontrolle (ca. 20 µl) zu W2 V,

**B** = Bakterienpellet (ca. 0,15 µl) nach Inkubation mit *M. sexta*-Hämolymphe und Desorption des potenziellen *B. megaterium*-bindenden Faktors,

**MWr** = relatives Molekulargewicht (Gemisch aus Sigma Low und High Marker)

### **3.4 Identifizierung und Charakterisierung der für eine zelluläre Immunabwehr möglicherweise notwendigen Hämozytenproteine mittels monoklonaler Antikörper**

Um Hämozytenproteine auf ihre Funktionalität hinsichtlich der zellulären Abwehr zu untersuchen, mussten die potenziell am Abwehrgeschehen beteiligten Proteine zunächst aus dem Pool der vorhandenen Hämozytenproteine selektiert werden. Dazu standen zwei  $\lambda$ ZAP-cDNA-Expressionsbanken (Hämozyten- und Fettkörperbank) zur Verfügung, die aus der mRNA von Hämozyten bzw. Fettkörper induzierter *M. sexta*-Larven (L5d2) erstellt worden waren (SCHOLZ 2002). Die beiden cDNA-Expressionsbanken wurden zuerst mit monoklonalen Antikörpern gegen Hämozytenproteine gescreent, deren genaue Spezifität z. T. noch nicht bekannt war. Ein Abgleich der Ergebnisse, die von der Hämozyten- bzw. Fettkörper-cDNA-Bank erhalten werden, sollte dabei die Hämozytenspezifität der potenziell attraktiven Proteine ausweisen. Bei einem positiven Ergebnis ist dann die Möglichkeit eröffnet, mit zwei qualitativ unterschiedlichen Ansätzen, der Nukleinsäure- bzw. der Proteinanalyse, die Funktionen zu klären. Die Resultate des Screenings wurden genutzt, um für die Aufgabenstellung attraktive Proteine auszuwählen, deren Funktion in weiteren Experimenten untersucht werden sollte. Ausgehend von der Hypothese, dass für die Bindung Gram-positiver Bakterien entweder ein Protein aus der Hämolymphe von *M. sexta* verantwortlich sein könnte oder die Bakterien selbst direkt an Hämozyten binden, wurde mit diesem Verfahren der Ansatz zur Suche nach einem Hämozytenprotein angegangen.

#### **3.4.1 Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper für das Screening von cDNA-Banken**

Um eine Auswahl geeigneter Antikörper zu treffen, wurden Hämozytenlysate einem Western-Blotting-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern gegen *M. sexta*- sowie gegen *D. melanogaster*-Hämozyten unterzogen.

Da für *D. melanogaster* bereits verschiedene am Abwehrgeschehen beteiligte Proteine bekannt sind, erschienen bei der Auswahl der Antikörper für das Screening der cDNA-Banken solche von *D. melanogaster* besonders attraktiv, die im Western Blot Kreuzreaktionen mit *M. sexta*-Hämozytenproteinen zeigten. Sollte es dann auch möglich sein, positive Klone aus den cDNA-Banken mit solchen

Antikörpern zu isolieren, so wäre die Identifizierung des *M. sexta*-Proteins durch den Sequenzvergleich mit einer Vielzahl Daten bei *D. melanogaster* sehr chancenreich.

Aus der Auswahl der vorhandenen mAks gegen *D. melanogaster* reagierte nur ein Antikörper, mAk 4c1, im Western Blot positiv auf *M. sexta* Hämocytenlysate.

Darüber hinaus wurden auch monoklonale Antikörper gegen *M. sexta*-Hämocyten auf *M. sexta*-Hämocytenlysate getestet, um diejenigen Antikörper herauszufiltern, die explizit an Hämocytenproteine und nicht an Hämolympheproteine binden. Von insgesamt 40 mAks reagierten 11 im Western Blot positiv.

Alle monoklonalen Antikörper, die im Western Blot auf *M. sexta*-Hämocytenlysate positiv reagierten, kamen für das Screening der cDNA-Banken grundsätzlich in die engere Auswahl.

### **3.4.2 Screening von Hämocyten- und Fettkörper-cDNA-Bank mit monoklonalen Antikörpern**

Zunächst wurden die beiden cDNA-Banken titriert. Für die Hämocyten-Bank ergab sich eine Konzentration von  $7,8 \times 10^8$  pfu/ml, für die Fettkörper-Bank eine Konzentration von  $5,4 \times 10^9$  pfu/ml.

Insgesamt wurde die Hämocyten-Bank mit neun verschiedenen monoklonalen Antikörpern gescreent, davon sechs gegen *M. sexta* (MS#77 auf ca. 28.000 pfu; MS#78 auf ca. 48.000 pfu; MS#75, MS#50, MS#30 und Z18E7 im Gemisch zu gleichen Anteilen auf ca. 20.000 pfu) und drei gegen *D. melanogaster* (4c1, 16c3 und 4a2 im Gemisch zu gleichen Anteilen auf ca. 20.000 pfu; MS#75, Z18E7 und 4c1 im Gemisch zu gleichen Anteilen auf ca. 40.000 pfu).

Die Fettkörperbank wurde mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen *M. sexta* gescreent (MS#77 auf ca. 35.000 pfu; MS#78 auf ca. 60.000 pfu)

Nur von einem monoklonalen Antikörper, mAk MS#78, konnten beim ersten Screening insgesamt fünf potenziell positive Plaques aus der Hämocytenbank und 13 aus der Fettkörperbank isoliert werden. Alle Isolate wurden einem zweiten Screening unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass nur zwei der Plaques aus der Hämocytenbank tatsächlich positiv waren. Im zweiten Screening wurden von einem der beiden positiven Plaques wiederum zwei Plaques isoliert, vom zweiten acht, die alle einem dritten Screening unterzogen wurden. Nach dem zweiten Screening der 13 Plaques aus der Fettkörperbank, stellten sich vier als tatsächlich

positiv heraus, von denen wiederum jeweils fünf isoliert wurden, die ebenfalls einem dritten Screening zur endgültigen Verifizierung unterzogen wurden. Im dritten Screening konnten die positiven Resultate des zweiten Screening bestätigt werden. Da nun die Plaques großen Abstand voneinander hatten, konnten einzelne Klone sicher isoliert werden und zwar jeweils fünf eines jeden positiven Isolates aus dem zweiten Screening. Letztendlich wurden mit dem monoklonalen Antikörper MS#78 aus der Hämozytenbank 10 und aus der Fettkörperbank 40 positive Klone isoliert, die von zwei bzw. vier „Ursprungs“-Klonen (zweites Screening) abstammten. Sechs Klone, zwei aus der Hämozytenbank und vier aus der Fettkörperbank (siehe dazu auch Abb. A1 im Anhang), wurden näher untersucht (siehe unten).

Auch mit mAk MS#77 wurden im ersten Screening zunächst scheinbar positive Plaques aus beiden cDNA-Banken isoliert, die sich aber im zweiten Screening als negativ herausstellten.

Mit keinem der weiteren monoklonalen Antikörper konnten positive Ergebnisse erzielt werden.

Von sechs der oben erwähnten mit MS#78 isolierten Klone wurde die einklonierte *M. sexta*-cDNA herausgeschnitten und mittels Agarosegel-Elektrophorese bzw. PCR die ungefähre Länge bestimmt (Tab. 7).

**Tab. 7:** Länge ausgewählter MS#78-Klone aus den *M. sexta*-cDNA-Banken

<b>Bezeichnung des Klons</b>	<b>ca. Anzahl der Basen der cDNA [bp]</b>
MH5/1-1i1	500 – 750
MH6/1-8i1	2.000 – 3.000
MF7/1-2i3	1.000 – 1.500
MF7/2-5i1	1.500
MF7/3-1i2	1.000
MF8/1-1i2	≥1.000

MH... = Klon aus der Hämozytenbank von *M. sexta*,

MF... = Klon aus der Fettkörperbank von *M. sexta*

Die cDNA folgender Klone wurde vollständig sequenziert: MH5/1-1i1 (Abb. 32), MH6/1-8i1 (Abb. 33) und MF7/3-1i2 (Abb. 34). Durch Vergleiche der Sequenz mit den Elektroferogrammen wurden manuell einzelne Basen korrigiert sowie die Plasmid-DNA und Restriktionsschnittstellen entfernt. Die Sequenzen sind bei der EMBL-Bank (<http://www.ebi.ac.uk/>) hinterlegt (Tab. 8).

**Tab. 8:** Eingangsnummern für drei bei der EMBL-Bank eingereichten Sequenzen

Accession no.	Identität	Klon
AJ863121	<i>mRNA for putative annexin IX-C</i>	MH5/1-1i1*
AJ863122	<i>mRNA for putative annexin IX-B</i>	MF7/3-1i2
AJ863123	<i>partial mRNA for putative annexin IX-A</i>	MH6/1-8i1

\*Da Klon MH5/1-1i1 nahezu identisch mit Klon MF7/2-5i1 ist, wurde entschieden die Sequenz nur eines der beiden Klone einzureichen.

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  CGGAATTCGC TCCGTACAAG TGAGGTTGGG TGTGTCGCTA ATTTACAAAA GAATCTTTCA 60
61 ACATGAGCGG ACAACAGTAC TACCCCTATA AGTGCACCCC CACGGTGTAC CCCGCGGAGC 120
121 CTTTCGACCC CGCGGCGGAT GCGGAGACCC TCCGCAAGGC TATGAAAGGG TTTGGCACC 180
181 ACGAGAAGGC CATCATCGAC GTCCTTTGCC GCCGCGGTAT CGTCCAGCGT CTGGAGATTG 240
241 CCGAAACTTT CAAGACTAAC TATGGCAAGG ACCTCATCAG CGAGTTGAAG AGCGAACTGA 300
301 GCGGCAACTT GGAGAACGTC ATCGTTGCGC TGATGACCCC CCTGCCACAC TTCTACGCTA 360
361 AGGAACTGCA CGACGCCGTC GCGGGACTCG GTACCGACGA GGAGGCGATC ATTGAGATCC 420
421 TGTGCACACT CTCAAACCTAC GGCATCCGCA CCATCTCAGC TTTCTACGAA CAATTATACA 480
481 ACAAGAGCTT GGAATCGGAT CTGAAAGGCG ACACATCTGG CCACTTCAAG AGGCTGTGTG 540
541 TTTCCCTATG TATGGCCAAC CGTGATGAGA ACCAGGGTGT GGACGAAGGC GCCGCTAGGG 600
601 CTGACGCTGA GGCCCTGGCC AACGCCGGCG AGGCACAATG GGCACCGAC GAGTCCGTCT 660
661 TCAACTCTAT TCTCATCACA CGATCCTACC AACAGCTGAG ACAGATATTC GCTGAATTCT 720
721 AGGCGTTGAC TGGAAAGGAC ATCGAAGAAT CTATCAAGAA GGAATTCTCT GGAAGCATCG 780
781 AGAAGGGCAT GCTTGCTATT GTGAAATGCG TAAAGAGCAA GGTTGGTTTC TTCGCTGAGC 840
841 GCCTGTACTA TTCCATGAAA GGGCTCGGTA CAAATGACAA GACCCTCATC AGAATCGTGG 900
901 TCAGCCGCTC CGAGATCGAC CTCGGGGACA TCAAACAGGC ATTCCTTGAC AAATACGGCA 960
961 AGCCCTTGA GAGCTGGATC GCTGATGACC TGACTGGTGA CTTCAGGAAT GTGCTAGTCA 1020
1021 CACTTTGTGC TTAACCCGTC AATACATTAG AGCTGTTATT TTTATATGAA TATTTGGTTA 1080
1081 AGCTTAGCAT GTTGTGTCGG AACGCTACAA AGTACAATAA TGGTTTGCAG GACGATACGA 1140
1141 AGGGCGACTT CAAACACGCG TTAAGTACCC TAGTGTGCTA GGGACGCATA CGCATTATAC 1200
1201 TGCAGACCGA TAGACATGCC TTTGAACCGT ATAAGTGTTA AGAGATGTTT AGAAATTAAA 1260
1261 GCTTGATATT TTTGTGAAAA TGAGATATTT ATTGGTGTCT TACTTTTGTT TACATTATAC 1320
1321 ATATTTACAT AATAATTATT AAATCACACT ATTATGTATG TTTAAAAAAA AAAAAAAA 1380
1381 AAAA

```

**Abb. 32:** cDNA-Sequenz von Klon MH5/1-1i1 (1.384 bp). Startcodon **braun** markiert, Isoform C spezifische Sequenz **blau** markiert



	1	11	21	31	41	51	
1	GCGAGTTGAA	GAGCGAACTG	AGCGGCAACT	TGGAGAACGT	CATCGTTGCG	CTGATGACCC	60
61	CCCTGCCACA	CTTCTACGCT	AAGGAACTGC	ACGACGCCGT	CGCGGGACTC	GGTACCGACG	120
121	AGGAGGCGAT	CATTGAGATC	CTGTGCACAC	TCTCAAACCTA	CGGCATCCGC	ACCATCTCAG	180
181	CTTCTACGA	ACAATTATAC	AACAAGAGCT	TGGAATCGGA	TCTGAAAGGC	GACACATCTG	240
241	GCCACTTCAA	GAGGCTGTGT	GTTTCCCTAT	GTATGGCCAA	CCGTGATGAG	AACCAGGGTG	300
301	TGGACGAAGG	CGCCGCTAGG	GCTGACGCTG	AGGCCCTGGC	CAACGCCGGC	GAGGGACAAT	360
361	GGGGCACCGA	CGAGTCCGTC	TTCAACTCTA	TTCTTATCAC	ACGATCCTAC	CAACAGCTGA	420
421	GACAGATATT	CGCTGAATTC	GAGGCGTTGA	CTGGAAAGGA	CATCGAAGAA	TCTATCAAGA	480
481	AGGAATTCTC	TGGAAGCATC	GAGAAGGGCA	TGCTTGCTAT	TGTGAAATGC	GTAAAGAGCA	540
541	AGGTTGGTTT	CTTCGCTGAG	CGCCTGTACT	ATTCCATGAA	AGGGCTCGGT	ACAAATGATA	600
601	AGACCCTCAT	CAGAATCGTG	GTCAGCCGCT	CCGAGATCGA	CCTCGGGGAC	ATCAAACAGG	660
661	CATTCTCTGA	CAAATACGGC	AAGCCCCTGG	AGAGCTGGAT	CGCTGTAAGT	TGTCTTGCAA	720
721	TAATCATTCA	TTCGGCACCT	TCATACGAAA	GGCTCAGTTG	AATATGCTTG	ATTGCTTCA	780
781	TATGAGAAAC	GCATTGAAAA	TTTATCAGTT	TAGTTTGATG	TTGAATTTAA	AGTTTCATTG	840
841	ATTATTTACT	GTATTTATTG	ATATAACCTA	TTGCATTTTT	AATAACTGTC	GTCCATAATC	900
901	ATTGTGTTCA	TAAAATTAAC	TCATTTGTCC	GTTGTTTGTC	TAATGTCTAA	CAAGCATGTG	960
961	TATTTCTATG	TTTATATATT	AATAGAAATA	TATAAACTGA	CCCATACTTC	TTTACGATAC	1020
1021	ACTGTTGTAA	TTGTGGCTGT	GCATTGCCCA	TACGACACAT	CACCTATAAA	ATCTAACCCT	1080
1081	CATTATAATA	TATACTTATT	ATACAGATCT	GTTTATAGGA	ATATTCAAGA	TTTAGTATAA	1140
1141	AGTCAATAAT	TTTGTGAAGT	TATCAGCAAA	TGTGTTAATT	GTCTAACAG	AGAAAAGCAC	1200
1201	TAATTGGCAT	ATGTAAGG	TTTATTTGTC	GACAAATGAA	TACAGTAGTT	CAGAATCCGT	1260
1261	TTTGATTGCA	GGACGACACT	TCCGGGGATT	ACAAGAAGGC	TTTATTGACC	CTAGTCGAAT	1320
1321	AAATTGTGTG	GTTCCCGAAT	GGTCAGGATC	ACTATGGTTG	ATATCCACCT	ATCTCGAATA	1380
1381	TTTAAAGTTT	TTTTTTTGTC	AATTTGCTAG	ATTATTAAGA	CAGTTAGGGC	TTGACGGCCG	1440
1441	ATCGTAAAGT	AAAACAAGCA	CAACGCTAGT	CTAGACGTTT	GCGGTCGTCG	GGTGTGCTAG	1500
1501	GTTATCGTGA	GATGTAAATT	TATTTGAGAT	CTGTATAGTT	CGCTTGTGAG	CACGGTCCCG	1560
1561	GTCATGTAAC	TCTTCCGTAG	CTAACAGCTT	TATGTGTCGC	GCTCGTGCAC	GAGGGTAACG	1620
1621	GTTCTCTATT	AGTTTTGCTT	AGTTTTACAA	GTAGTTGTTG	GTTTTTCAGG	AGGACATAGG	1680
1681	AGGTCCGCTC	GGCGAACTCC	TATCAACAAT	GTGTTACTAA	AGCCTACACT	GCTATAACAT	1740
1741	TAACACTCAG	TATTACGAGC	GCCATTCCGT	TATACGCCAA	CGCAGTGTC	AGTAAAGCAA	1800
1801	ACTATTTATT	GCATCTATTG	TACCCGAGTA	CACTTATGTG	CATTTTAAAG	ACATTATATA	1860
1861	ATTAATTTAA	GCTATTTAAT	CATTGTGATT	TCCATTCTCA	TGTATAGTCA	GAACCAAGAA	1920
1921	TGCACGTTTG	AAGTTTGAGC	GCAGTGGTTT	GAACATATGGG	CCAGTTTATT	TTGTTTCGCTA	1980
1981	ACATGTGAAG	CGTGAGCGCG	TTTTCCGCTG	TTGTTTACAG	GATGACCTGA	CTGGTGACTT	2040
2041	CAGGAATGTG	CTAGTCACAC	TTTGTGCTTA	ACCCTGCAAT	ACATTAGAGC	TGTTATTTTT	2100
2101	ATATGAATAT	TTGGTTAAGC	TTAGCATGTT	GTTGCGGAAC	GCTACAAAGT	ACAATAATGG	2160
2161	TTTGCAGGAC	GATACGAAGG	GCGACTTCAA	ACACGCGTTA	CTGACCCTAG	TGTCGTAGGG	2220
2221	ACGCATACGC	ATTATACTGC	AGACCGATAG	ACATGCCTTT	GACCCGTATA	ACTGTTAAGA	2280
2281	GATGTTTAGA	AATTAAAGCT	TGATATTTTT	GTGAAAATGA	GATATTTATT	GGTGCTGTAC	2340
2341	TTTGTGTTAC	ATTATACATA	TTTACATTAT	AATTATTAAA	TCACACTATT	ATGTATGTTA	2400
2401	AAAAGAGAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAA			

**Abb. 33:** cDNA-Sequenz von Klon **MH6/1-8i1** (2.434 bp). Isoform A spezifische Sequenz **rot** markiert, Isoform B spezifische Sequenz **gelb** markiert, Isoform C spezifische Sequenz **blau** markiert, potenzielles Intron **magenta** markiert

1	11	21	31	41	51	
1	CGGAATTCGC	TCCGTACAAG	TGAGGTTGGG	TGTGTCGCTA	ATTTACAAAA	GAATCTTTCA 60
61	ACATGAGCGG	ACAACAGTAC	TACCCCTATA	AGTGCACCCC	CACGGTGTAC	CCCGCGGAGC 120
121	CTTTCGACCC	CGCGGCGGAT	GCGGAGACCC	TCCGCAAGGC	TATGAAAGGG	TTTGGCACC G 180
181	ACGAGAAGGC	CATCATCGAC	GTCCTTTGCC	GCCGCGGTAT	CGTCCAGCGT	CTGGAGATCG 240
241	CCGAAACTTT	CAAGACTAAC	TATGGCAAGG	ACCTCATCAG	CGAGTTGAAG	AGCGAACTGA 300
301	GCGGCAACTT	GGAGAACGTC	ATCGTTGCGC	TGATGACCCC	CCTGCCACAC	TTCTACGCTA 360
361	AGGAAGTGC	CGACGCCGTC	GCGGGACTCG	GTACCGACGA	GGAGGCGATC	ATTGAGATCC 420
421	TGTGCACACT	CTCAAACCTAC	GGCATCCGCA	CCATCTCAGC	TTTCTACGAA	CAATTATACA 480
481	ACAAGAGCTT	GGAATCGGAT	CTGAAAGGCG	ACACATCTGG	CCACTTCAAG	AGGCTGTGTG 540
541	TTTCCCTATG	TATGGCCAAC	CGTGATGAGA	ACCAGGGTGT	GGACGAAGGC	GCCGCTAGGG 600
601	CTGACGCTGA	GGCCCTGGCC	AACGCCGGCG	AGGGACAATG	GGGCACCGAC	GAGTCCGTCT 660
661	TCAACTCTAT	TCTTATCACA	CGATCCTACC	AACAGCTGAG	ACAGATATTC	GCTGAATTCG 720
721	AGGCGTTGAC	TGGAAGGAC	ATCGAAGAAT	CTATCAAGAA	GGAATTCTCT	GGAAGCATCG 780
781	AGAAGGGCAT	GCTTGCTATT	GTGAAATGCG	TAAAGAGCAA	GGTTGGTTTC	TTCGCTGAGC 840
841	GCCTGTACTA	TTCCATGAAA	GGGCTCGGTA	CAAATGATAA	GACCCTCATC	AGAATCGTGG 900
901	TCAGCCGCTC	CGAGATCGAC	CTCGGGGACA	TCAAACAGGC	ATTCCTTGAC	AAATACGGCA 960
961	AGCCCCCTGA	GAGCTGGATC	GCTGAGGACA	TAGGAGGTCC	GCTCGGCGAA	CTCCTATCAA 1020
1021	CAATGTGTTA	CTAAAGCCTA	CACTGCTATA	ACATTAACAC	TCAGTATTAC	GAGCGCCATT 1080
1081	CCGTTATACG	CCAACGCAGT	GTCAAGTAAA	GCAAACCTAT	TATTGCATCT	ATTGTAACCG 1140
1141	AGTACACTTA	TGTGCATTTT	AAAGACATTA	TATAATTAA	TTAAGCTATT	TAATCATTGT 1200
1201	GATTTCCATT	CTCATGTATA	GTCAGTACCA	AGAATGCACG	TTTGAAGTTT	GAGCGCAGTG 1260
1261	GTTTGAACCTA	TGGGCCAGTT	TATTTTGTTC	GCTAACATGT	GAAGCGTGAG	CGCGTTTTTC 1320
1321	GCTGTTGTTT	ACAGGATGAC	CTGACTGGTG	ACTTCAGGAA	TGTGCTAGTC	ACACTTTGTG 1380
1381	CTTAACCCCTG	CAATACATTA	GAGCTGTTAT	TTTTATATGA	ATATTTGGTT	AAGCTTAGCA 1440
1441	TGTTGTTGCG	GAACGCTACA	AAGTACAATA	ATGGTTTGCA	GGACGATACG	AAGGGCGACT 1500
1501	TCAAACACGC	GTTACTGACC	CTAGTGTCGT	AGGGACGCAT	ACGCATTATA	CTGCAGACCG 1560
1561	ATAGACATGC	CTTTGAACCG	TATAACTGTT	AAGAGATGTT	TAGAAATTAA	AGCTTGATAT 1620
1621	TTTTGTGAAA	ATGAGATATT	TATTGGTGCT	GTACTTTTGT	TTACATTATA	CATATTTACA 1680
1681	TTATAATTAT	TAAATCACAC	TATTATGTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA	

**Abb. 34:** cDNA-Sequenz von Klon **MF7/3-1i2** (1.726 bp). Startcodon **braun** markiert  
Isoform B spezifische Sequenz **gelb** markiert, Isoform C spezifische Sequenz **blau**  
markiert

Gleiche Farben in den Sequenzen (Abb. 32 – 34) weisen auf nahezu identische Teilsequenzen hin. Das **Startcodon** für die Translation wurde, sofern es in der cDNA-Sequenz vorhanden, ist markiert.

Die weiteren in Tabelle 7 genannten Klone, MF7/1-2i3 (Abb. 35), MF7/2-5i1 (Abb. 36) und MF8/1-1i2 (Abb. 37) wurden von beiden Seiten ansequenziert, d. h. es liegen jeweils zwei Sequenzen für jeden Klon vor: jeweils der Beginn der Sequenz vom 5'-Ende eines jeden der beiden cDNA-Stränge und das 3'-Ende mit dem PolyA-Schwanz. Zur besseren Lesbarkeit – v. a. in den Abbildungen im Anhang – wird die Sequenz des (-)-Stranges revers und konvertiert dargestellt und mit dem Zusatz „3'-Ende“ versehen im Gegensatz zum 5'-Ende des (+)-Stranges (Zusatz: „5'-Ende“). Alle Sequenzen sind in Abbildung A5 im Anhang dargestellt. Aus dem *Alignment* dort geht hervor, dass für Klon MF7/2-5i1 bereits die volle Sequenzierung der cDNA-Sequenz gelungen war (siehe Kap. 3.4.3). Die in

Abbildung 36 dargestellte vollständige Sequenz ist jeweils aus den eindeutigen Teilsequenz zusammen gesetzt, die keine unklaren Nukleotide enthalten.

a.

	1	11	21	31	41	51	
1	GTGAGGTTGG	GTGTGTCGCT	AATTTACAAA	AGAATCTTTC	AACATGAGCG	GACAACAGTA	60
61	CTACCCCTAT	AAGTGACACC	CCACGGTGTA	CNCCGCGGA	GCCTTTCGAC	TCCCGCNNCG	120
121	GATGCGGAGA	CCCTCCGCAA	GGCTNTGAAA	GGGTTTGGCA	CCGACGATGA	AGGCCATCAT	180
181	CGACGTCTCT	TTGCCGCGGN	GGTATNGTCC	AGCGTCTGGA	GATCGCTCGA	AACTTNCAAG	240
241	ACTAACTATG	GCAAGGACCT	CATNAGCGAG	TTGAAGAGCG	AACTGAGCGG	CAACTTGGAG	300
301	AACGTCATCG	TTGCGCTGAT	GACCCCCCG	CCACACTACT	ACGCTAANGA	ACTGNTCNAC	360
361	NCCGTTGCCG	GGACCTCGGT	ACCGACGAGG	AGGCGATNAT	TTGAGATCCC	TGTGCACCC	420
421	CTCAAACCTAC	GGCANTCCGC	ACCATCTNAG	CTTCTACGA	TCAATTATAC	AACAAGNAGC	480
481	TTNGGAATNG	GATCTGAAAG	GCGACACATC	TNGGNCANTT	TCAAAAAGGC	TGCAGTGTTT	540
541	CCCCTATGGT	ATGGGCCCCAN	ACCGTTGTAT	NAGACTNCAA	GGTNTTGNGA	CCNAAAGCCG	600
601	CACGATATGT	NCTGACNNCT	GANNGNCCTT	GGCNCAACNN	CCNGTTCGNA	TGNGACATTG	660
661	GGAGCACCNN	ACNAGNANCN	GNNCTNCNTC	CTCNTNTNTC	TTCANACAN	TAANCCTTNC	720
721	CACACANCCN	NTTGANAGTN	TNTTCNTTCT	GNNCTTACGN	AGGCCNCTTG	GACTTGNTAA	780
781	AGGNCNTTCG	TNAAATNATC	TTTTTNNATG	AAAGGGAAAT	TNTNTTTGGA	AATNCANNCN	840
841	ANTAAGGGTN	TNTNCTTCNG	CTNTTNTTCG	GAAANAGCGN	GTNAANNAGG	AAGGGTNCGG	900
901	GATTNNNCTT	CGTCTCGANC	CNGCNCNGNT	ACCTAATACC	CTTGNAANAG	GGGGTNCNN	960
961	CAANANTNAC	NNCAATCGAN	CTNTTCTTTA	TACAAATTAG	NGNGTTCAAN	CNNGTNTTTC	1020
1021	NGNAAACNTA	NNTCGNGGGN	NCTTANTAAC	ATGGTNTTNC	TTGTGTACAT	ANANGTGTA	1080
1081	NCCCTCTNGA	AGNTGTGNNT	NCCT				

b.

	1	11	21	31	41	51	
1	CNTTNCNNC	NCNTAAACAA	CAGNGCNANN	NNTTTTCATC	NCCANAANCA	ACAAAATTNN	60
61	ATTNNCNCGT	TGACGCCCC	NGTTAATATN	CCAATANGGG	CCTCNGGCCA	AAAACANGAA	120
121	TAACCCCTCC	TCNNAATTC	TGTATACCAC	ACCNTNCCAA	NAAATNCTCC	CCTAGACNAN	180
181	CTANAAACCN	AAACNTTTC	NTTTACNCNN	AATNCCNCCC	AAGACNCNCC	TCAAAAAANA	240
241	CCTGGAGTCT	ACNTANAGAN	NNACNAAGAG	AAGACCCCAT	CTCCNNANCC	NACTTACANC	300
301	NAATNCACNC	NAAANTNTT	TTGANCNAAA	NCACNACNCN	NNNTTTTNTN	AAACNCCTCT	360
361	TTTGNCNCTN	CCNATANNAT	TNNGCNGTAG	CTNCTCNTT	CCNTTTTAAA	TATCCCNCC	420
421	CANTNCCNCC	ANTTTTCNAA	NATTAATAAN	CCCNAACCCC	TATAGTTNAT	NCCGCTCCCT	480
481	TNGNGTNATG	CTCACANTNA	NCCNNNNNTN	NNTANTCTTT	TTTAAACACC	CCCCTATNTN	540
541	ANTNTNCATT	TTAAACCATC	TTTAACNCCC	ATTGNNAATTN	NCCNCTCNCC	CNNCNCNAAAT	600
601	ACTCAANCA	CCANAAAAAC	CCCCNCTTTT	AANTTTTAAA	CNCCCNCTNN	ATTTATAANA	660
661	NAATNANCCN	CNTATTTTTT	CTNTTCCANC	NACCTTTTAA	AANCNGTGAC	ACNCTTTTNC	720
721	CCNNTTNTNT	TNNACCNAAA	ANTCNCCCCA	CCTNGNCANT	NCANAAAATN	AACTTTANCC	780
781	CNCNTNGTNT	TNCCCCCNC	AANCCNTNAA	AANTNGTTTT	TTTANNNAAT	NNTTNTTAA	840
841	NTTANCATN	TTTTTCCNAA	ANCCCNCAAA	AANCCNANAN	TGGTTTCCAN	NCCNTTCCAA	900
901	ANNACACNTT	CAACCNCCCN	NTCATACCCC	NANTTTNTTA	NGCNCCCNNT	CCNNTTTANN	960
961	TCCNNNCCNA	AAANCANCCC	TTTGNCNCCN	AAANNTTTTA	AAAAATTTTT	NAAANTNCCC	1020
1021	GCCCCCNANT	TTTTTTAAAA	TNAANANTTT	TTTGGNGCNG	ACCTTTTTTT	NCCCTTNTCC	1080
1081	NNATTTCCNT	TNNAAATTTT	NANNCCCCCT	TTTNTNTNTG	TCTTCNAAAA	AAAAAAAATN	1140
1141	NAAAAA	AAAAA	ATNAAAA				

**Abb. 35:** cDNA-Sequenz von Klon **MF7/1-2i3**. a. Ansequenzierung des 5'-Endes der Sequenz b. Ansequenzierung des 3'-Endes (Sequenz in 5'-3'-Leserichtung dargestellt)

	1	11	21	31	41	51	
1	CGGAATTCGC	TCCGTACAAG	TGAGGTTGGG	TGTGTCGCTA	ATTTACAAAA	GAATCTTTCA	60
61	AC <b>ATG</b> AGCGG	ACAACAGTAC	TACCCCTATA	AGTGCACCCC	CACGGTGTAC	CCCGCGGAGC	120
121	CTTTCGACCC	CGCGGCGGAT	GCGGAGACCC	TCCGCAAGGC	TATGAAAGGG	TTTGGCACCG	180
181	ACGAGAAGGC	CATCATCGAC	GTCCTTTGCC	GCCGCGGTAT	CGTCCAGCGT	CTGGAGATCG	240
241	CCGAAACTTT	CAAGACTAAC	TATGGCAAGG	ACCTCATCAG	CGAGTTGAAG	AGCGAACTGA	300
301	GCGGCAACTT	GGAGAACGTC	ATCGTTGCGC	TGATGACCCC	CCTGCCACAC	TTCTACGCTA	360
361	AGGAAC TGCA	CGACGCCGTC	GCGGGACTCG	GTACCGACGA	GGAGGCGATC	ATTGAGATCC	420
421	TGTGCACACT	CTCAAAC TAC	GGCATCCGCA	CCATCTCAGC	TTTCTACGAA	CAATTATACA	480
481	ACAAGAGCTT	GGAATCGGAT	CTGAAAGGCG	ACACATCTGG	CCACTTCAAG	AGGCTGTGTG	540
541	TTTCCCTATG	TATGGCCAAC	CGTGATGAGA	ACCAGGGTGT	GGACGAAGGC	GCCGCTAGGG	600
601	CTGACGCTGA	GGCCCTGGCC	AACGCCGCGC	AGGGACAATG	GGGCACCGAC	GAGTCCGCTCT	660
661	TCAACTCTAT	TCTTATCACA	CGATCCTACC	AACAGCTGAG	ACAGATATTC	GCTGAATTCG	720
721	AGGCGTTGAC	TGGAAAGGAC	ATCGAAGAAT	CTATCAAGAA	GGAATTCTCT	GGAAGCATCG	780
781	AGAAGGGCAT	GCTTGCTATT	GTGAAATGCG	TAAAGAGCAA	GGTTGGTTTC	TTCGCTGAGC	840
841	GCCTGTACTA	TTCCATGAAA	GGGCTCGGTA	CAAATGATAA	GACCCTCATC	AGAATCGTGG	900
901	TCAGCCGCTC	CGAGATCGAC	CTCGGGGACA	TCAAACAGGC	ATTCTTGTGAC	AAATACGGCA	960
961	AGCCCCTGGA	GAGCTGGATC	GCTGATGACC	TGACTGGTGA	CTTCAGGAAT	GTGCTAGTCA	1020
1021	CACTTTGTGC	TTAACCCTGC	AATACATTAG	AGCTGTTATT	TTTATATGAA	TATTTGGTTA	1080
1081	AGCTTAGCAT	GTTGTTGCGG	AACGCTACAA	AGTACAATAA	TGGTTTGCAG	GACGATACGA	1140
1141	AGGGCGACTT	CAAACACGCG	TTACTGACCC	TAGTGTCGTA	GGGACGCATA	CGCATTATAC	1200
1201	TGCAGACCGA	TAGACATGCC	TTTGAACCGT	ATAACTGTTA	AGAGATGTTT	AGAAATTAAA	1260
1261	GCTTGATATT	TTTGTGAAAA	TGAGATATTT	ATTGGTGCTG	TACTTTTGTT	TACATTATAC	1320
1321	ATATTTACAT	TATAATTATT	AAATCACACT	ATTATGTATG	TTTCAAAAAA	AAAAAAAAAA	1380
1381	AAAAAAAA						

**Abb. 36:** cDNA-Sequenz von Klon **MF7/2-5i1** (1.388 bp). Startcodon **braun** markiert, Isoform C spezifische Sequenz **blau** markiert

a.

	1	11	21	31	41	51	
1	GCGGGACTCG	GTACCGACGA	GGAGGCGATC	ATTGAGATCC	TGTGCACACT	CTCAAACTAC	60
61	GGCATCCGCA	CCATCTCAGC	TTTCTACGAA	CAATTATACA	ACAAGAGCTT	GGAACCCNCA	120
121	TCTGAAAGGC	GACACATCTG	GCCACTTCAA	GAGGCTGTGC	GTTTCCNTAT	GTATGGCCAA	180
181	CCGTGATGAG	AACCAGGGTG	TGGACNAAGG	CGCCGCTAGG	GCTGACGCTG	AGGCCCTGGC	240
241	CAACGCCGGC	GAGGGACAAT	GGGGCACC GA	CGAGTCCGTC	TTCAACTCTA	TTCTCATCAC	300
301	ACGATCCTAC	CAACAGCTGA	GACAGATATN	CGTGGAATTC	GAGGCACTNG	ACTTGGAAAG	360
361	GACATCNNTG	TAATTCTATC	AAGAAGGAAT	ACTCTGGCAA	GCATCTGAGA	GAGGGCATGC	420
421	TTGCTATTGT	GAAATGCCGT	AAAGTAGCAA	GGTTTGNTTT	TCTTCNGCTG	AGCGCCTATT	480
481	ACTAATTCCA	TTGANAAAGG	CTTCNGNTCA	AATGACAAGG	ACCCCTTATC	AGAAATTNTN	540
541	NGTNAGNTCG	CTTCCGAGAA	TCGACCTNGN	CGTGACATTT	AAACCAGGCN	ATTCCTTTGA	600
601	NCANNTACGG	NCAAAGCCCC	TTGGNAGTAA	CTGGGGATTG	GCTTGAGGGA	CATAAGGAGG	660
661	TTCCGGNTTT	GGCCGAANTN	TCNTNNTNAA	ANAGACGCTG	GTTAACTCAA	ANACCCTNCN	720
721	CCTNGTCTTT	TANCATNNNA	ACNCTTCNGN	TNNTTANCGG	AGTCGCCCCC	TTNNNGGTTT	780
781	TGTACGTCCC	AACGTCTAGT	GGTTAAANTA	TACATCNANG	CNNTTTCTAA	TTTGCCNATN	840
841	TNNTTGTGAN	CCCTTNCGNA	CCNCTNCTAT	GGTGNCNTTT	TTAATNGAAC	NCNTTNTTAT	900
901	GNNCNTGCAA	TTAAANGCTC	TTTTGATTCT	ANCTTGTTGT	ATTNTNCCNT	TATCTACAAG	960
961	GGTTTTGGTC	CNNTTCTCCA	CNAAATGNCC	CGCTNTTGGA	AAAATCATGC	ACCGNTCATG	1020
1021	NCNTTTANGA	NACNTNTGGA	GTCTCCTGTN	AATTTTTTGG	TTGNTCAAC	AATGTNTGNA	1080
1081	ACGCCGCTNC	CCG					

b.

	1	11	21	31	41	51	
1	ANCCCANACA	AAAAAAATTA	TTNNNCANAC	NCNCAAAAAA	GNGACAATCN	CTATNAGNGA	60
61	AANNGNCANA	NGACCGCATN	NGCTTAACCG	GNGGACACAC	CGNAAAGATC	CCNNNAAANN	120
121	AANGAGGNGN	NNAGGNANAA	NAACNAACGC	CTCNANCANN	ANAGGGGNCC	ANNCNNNCNN	180
181	AGNATCNCNC	CCGGGNACN	TCGNGACAGG	CATTCTTNTC	CAATACGCCA	AGNCCCTGGA	240
241	ANATATGGAN	CNCAAAAGAA	CAAAGGAGGA	NCCGCCANGA	ANANACTTCT	TAANNAACNA	300
301	TTNTNTATNT	GAGAAACNNG	NCANTTAAAA	NAACNATAAN	CACTACAAGT	ATANCANGNC	360
361	NCCATTNCGG	TTNNTACGAC	CAACACAGTG	TGCAAGGNAA	AACCAATCTA	TTTTTNTGCA	420
421	TNTAATTGNA	NCNGAGNACN	NTTAATGTGC	TTTTTAAANN	CATTTATATT	ATTTATTTAA	480
481	ACCTATTTAA	NCTTTGTGAT	TTCCCATTTCT	CAGTGATANAG	TCGAGNANCC	AAAGAATGCA	540
541	CNTTTAAAAA	TTTNNGCGCA	ATGGTTTAAA	NTAGTGGACC	AGTTTATTTN	TGTTCCGCTA	600
601	ACATGTNAAG	CGTGAGCGCG	TTTCCCGNTG	TTGTTTACAN	AAGNGACCTN	ANTGGTNNCT	660
661	TCAGGAATGT	GCTAGGTCNC	CCTTTGTGCT	TAACCCTGCA	ATACATTAGA	GGCTGTTATT	720
721	TTTATATNAA	TATTTGGTTA	AGCTTAGCAT	GTTGTTGCGG	AACGCTACAA	AGNTCAATAA	780
781	TGGTTTGCG	GACGATACNA	AGGGCGACTT	CAAACACGCG	TTACTGNCCN	NAGTGTGCTA	840
841	NGGACGCATA	CGCATTATAC	TGCAGNCCGA	TAGACANGCC	TTTGANGGGT	ATANCTGTTA	900
901	ANAGATGTTT	ANAAATTAAA	GCTTGATATT	TTTGTGAAAA	TGAGATATTT	ATTGGTGCTG	960
961	CACTTTTGTT	NNCATTANAC	ATATTTACAN	AGATAATTAT	TAAANCNCAC	TATTATGNAT	1020
1021	GTTTCAAAAA	AAAAAATNAA	AAANGNANTN	AAAAACCCCA	AAAANGNGGN	TTTTCCCCNA	1080
1081	A						

**Abb. 37:** cDNA-Sequenz von Klon **MF8/1-1i2**. **a.** Ansequenzierung des 5'-Endes der Sequenz. **b.** Ansequenzierung des 3'-Endes (Sequenz in 5'-3'-Leserichtung dargestellt)

Aufgrund der Vielzahl der unklaren Basenidentifizierung (N), wurde bei den beiden Klonen MF7/1-2i3 und MF8/1-1i2 auf eine manuelle Korrektur durch Vergleich mit den Elektroferogrammen verzichtet. Es wird empfohlen diese Klone erneut zu sequenzieren.

### 3.4.3 Datenbank-Recherchen

Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen aller MS#78-Klone mit Sequenzen verschiedener Datenbanken (WU-Blast2, EMBL bzw. NCBI) ergab jeweils hohe Übereinstimmungen (Tab. 9) mit Annexin IX-Isoformen von *B. mori*.

**Tab. 9:** Ergebnis eines Nukleotid-Blasts (WU-Blast2, EMBL; STOESSER et al. 2002) von vier ausgewählten MS#78-Klonen

Klon	Datenbank-Ergebnis	Score	% Identität	% Positive	E-Wert <sup>4)</sup>
MH5/1-1i1	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A <sup>1)</sup>	3480	82	82	3,2 e <sup>-187</sup>
MH6/1-8i1	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A <sup>3)</sup>	2402	82	82	9,4 e <sup>-166</sup>
MF7/3-1i2	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-B <sup>2)</sup>	3608	81	81	8,2 e <sup>-209</sup>
MF7/2-5i1 <sup>3)</sup>	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A <sup>1)</sup>	3439	82	82	4,8 e <sup>-186</sup>

<sup>1)</sup> Accession no. AB030496 (Genbank) <sup>3)</sup> als potenziell vollständige Sequenz (Abb. 38)

<sup>2)</sup> Accession no. AB030497 (Genbank) <sup>4)</sup> Expectation Value

Das Ergebnis des Nukleotid-Blasts der zwei anderen ansequenzierten Klone (MF7/1-2i3 und MF8/1-1i2) ist Tabelle B1 im Anhang dargestellt (siehe dort G04 bzw. G03).

Ein Vergleich der drei vollständig sequenzierten Klone miteinander sowie ein Vergleich dieser drei Klone mit den entsprechenden Sequenzen der drei Annexin IX-Isoformen von *B. mori* ergab, dass es sich bei zwei Klonen (MH5/1-1i1 und MF7/3-1i2) um sog. „full length“-Klone handelt, d. h. sie enthalten sowohl das Startcodon für die Translation, die stromaufwärts liegende 5'-nichttranslatierte Region (5'-UTR) als auch das Stoppcodon für das Translationsende und darüber hinaus auch den Poly(A)-Schwanz der mRNA (Abb. A6 im Anhang). Da Klon MF7/2-5i1 Klon MH5/1-1i1 entspricht, handelt es sich auch bei letzterem um einen „full length“-Klon.

Aus dem *Alignment* der drei Klone wurde das fehlende 5'-Ende der cDNA von Klon MH6/1-8i1 postuliert. Außerdem wird ein Intron in der cDNA von Klon MH6/1-8i1 vermutet (siehe Kap. 3.4.4). Die postulierte vollständige Intron-bereinigte Sequenz wurde als Grundlage für die Translation in die Aminosäuresequenz

benutzt. Die cDNA-Sequenz dieses Klons ist die potenzielle Isoform A des *M. sexta*-Annexin IX (Abb. 38).

	1	11	21	31	41	51	
1	CGGAATTCGC	TCCGTACAAG	TGAGGTTGGG	TGTGTCGCTA	ATTTACAAAA	GAATCTTTTCA	60
61	ACATGAGCGG	ACAACAGTAC	TACCCCTATA	AGTGCACCCC	CACGGTGTAC	CCCAGCGGAGC	120
121	CTTTCGACCC	CGCGGCGGAT	GCGGAGACCC	TCCGCAAGGC	TATGAAAGGG	TTTGGCACCG	180
181	ACGAGAAGGC	CATCATCGAC	GTCCTTTGGC	GCCGCGGTAT	CGTCCAGCGT	CTGGAGATCG	240
241	CCGAAACTTT	CAAGACTAAC	TATGGCAAGG	ACCTCATCAG	CGAGTTGAAG	AGCGAACTGA	300
301	GCGGCAACTT	GGAGAACGTC	ATCGTTGCGC	TGATGACCCC	CCTGCCACAC	TTCTACGCTA	360
361	AGGAACTGCA	CGACGCCGTC	GCGGGACTCG	GTACCGACGA	GGAGGCGATC	ATTGAGATCC	420
421	TGTGCACACT	CTCAAACCTAC	GGCATCCGCA	CCATCTCAGC	TTTCTACGAA	CAATTATACA	480
481	ACAAGAGCTT	GGAATCGGAT	CTGAAAGGCG	ACACATCTGG	CCACTTCAAG	AGGCTGTGTG	540
541	TTTCCCTATG	TATGGCCAAC	CGTGATGAGA	ACCAGGGTGT	GGACGAAGGC	GCCGCTAGGG	600
601	CTGACGCTGA	GGCCCTGGCC	AACGCCGGCG	AGGGACAATG	GGGCACCGAC	GAGTCCGTCT	660
661	TCAACTCTAT	TCTTATCACA	CGATCCTACC	AACAGCTGAG	ACAGATATTC	GCTGAATTCTG	720
721	AGGCGTTGAC	TGGAAGGAC	ATCGAAGAAT	CTATCAAGAA	GGAATTCTCT	GGAAGCATCG	780
781	AGAAGGGCAT	GCTTGCTATT	GTGAAATGCG	TAAAGAGCAA	GGTGTGGTTTC	TCGCTGAGC	840
841	GCCTGTACTA	TTCCATGAAA	GGGCTCGGTA	CAAATGATAA	GACCCTCATC	AGAATCGTGG	900
901	TCAGCCGCTC	CGAGATCGAC	CTCGGGGACA	TCAAACAGGC	ATTCCCTGAC	AAATACGGCA	960
961	AGCCCTTGA	GAGCTGGATC	GCTGACGACA	CTCCGGGGA	TTACAAGAAG	GCTTTATTGA	1020
1021	CCCTAGTCGA	ATAAATTGTG	TGTTTCCCGA	ATGGTCAGGA	TCACTATGGT	TGATATCCAC	1080
1081	CTATCTCGAA	TATTTTAAGT	TTTTTTTTTG	TCAATTTGCT	AGATTATTAA	GACAGTTAGG	1140
1141	GCTTGACGGC	CGATCGTAAA	GTAAAACAAG	CACAACGCTA	GTCTAGACGT	TCGCGGTCGT	1200
1201	CGGGTGTGCT	AGGTTATCGT	GAGATGTAAA	TTTATTTGAG	ATCTGTATAG	TTGCTTGTG	1260
1261	AGCACGGTCC	CGGTCATGTA	ACTCTTCCGT	AGCTAACAGC	TTTATGTGTC	GCGCTCGTGC	1320
1321	ACGAGGTAA	CGGTTCTCA	TTAGTTTTCG	TTAGTTTTCG	AAGTAGTTGT	TGTTTTCCTA	1380
1381	GGAGGACATA	GGAGGTCCGC	TCGGCGAACT	CCTATCAACA	ATGTGTTACT	AAAGCCTACA	1440
1441	CTGCTATAAC	ATTAACACTC	AGTATTACGA	GCGCCATTCC	GTTATACGCC	AACGCAGTGT	1500
1501	CAAGTAAAGC	AACTATTTTA	TTGCATCTAT	TGTACCCGAG	TACACTTATG	TGCATTTTAA	1560
1561	AGACATTATA	TAATTAATTT	AAGCTATTTA	ATCATTGTGA	TTTCCATTCT	CATGTATAGT	1620
1621	CAGAACCAAG	AATGCACGTT	TGAAGTTTGA	GCGCAGTGGT	TTGAACTATG	GGCCAGTTTA	1680
1681	TTTTGTTTCG	TAAATGTGA	AGCGTGAGCG	CGTTTTCGCG	TGTTGTTTAC	AGGATGACCT	1740
1741	GACTGGTGAC	TTCAGGAATG	TGCTAGTCAC	ACTTTGTGCT	TAACCCTGCA	ATACATTAGA	1800
1801	GCTGTTATTT	TTATATGAAT	ATTTGGTTAA	GCTTAGCATG	TTGTTGCGGA	ACGCTACAAA	1860
1861	GTACAATAAT	GGTTTGCAGG	ACGATACGAA	GGGCGACTTC	AAACACGCGT	TACTGACCCT	1920
1921	AGTGTCGTAG	GGACGCATAC	GCATTATACT	GCAGACCGAT	AGACATGCCT	TTGACCCGTA	1980
1981	TAAGTGTTAA	GAGATGTTTA	GAAATTAAAG	CTTGATATTT	TTGTGAAAAT	GAGATATTTA	2040
2041	TTGGTGCTGT	ACTTTTGTTC	ACATTATACA	TATTTACATT	ATAATTATTA	AATCACACTA	2100
2101	TTATGTATGT	TAAAAAGAGA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA		

**Abb. 38:** Postulierte vollständige Intron-bereinigte Sequenz der *M. sexta*-Annexin IX-Isoform A ausgehend von Klon MH6/1-8i1. Postulierte Teilsequenz grün markiert, Isoform A spezifische Sequenz rot markiert, Isoform B spezifische Sequenz gelb markiert, Isoform C spezifische Sequenz blau markiert, Startcodon braun markiert

Nach Übersetzung („DNA-Protein Translation“ des ExPASy Servers unter <http://www.expasy.org>) der cDNA-Sequenzen der drei Klone MH5/1-1i1 (Abb. 41), MH6/1-8i1 bzw. der auf diesem Klon beruhenden postulierten vollständigen Intronbereinigten Sequenz (Abb. 39) und MF7/3-1i2 (Abb. 40) und Auswahl des *Open Reading Frames* (offenen Leseraster) wurden die Aminosäuresequenzen ebenfalls mit Datenbankeinträgen (WU-Blast2, EMBL) verglichen (Tab. 10). Auch hier lagen jeweils hohe Übereinstimmungen mit den Sequenzen der verschiedenen Isoformen von *B. mori* Annexin vor.

**Tab. 10:** Ergebnisse des Proteinvergleichs (WU-Blast2, EMBL; STOESSER et al. 2002) der potenziellen *M. sexta*-Annexin IX-Isoformen

potenzielle <i>M. sexta</i> Proteinisoform	Datenbank-Ergebnis	Score	% Identität	% Positive	E-Wert <sup>7)</sup>
Annexin IX-A <sup>1)</sup>	<i>B. mori</i> Annexin IX-A <sup>4)</sup>	1587	94	98	2,1 e <sup>-162</sup>
Annexin IX-B <sup>2)</sup>	<i>B. mori</i> Annexin IX-B <sup>5)</sup>	1581	93	98	9,1 e <sup>-162</sup>
Annexin IX-C <sup>3)</sup>	<i>B. mori</i> Annexin IX-C <sup>6)</sup>	1572	93	98	8,2 e <sup>-161</sup>

<sup>1)</sup> beruht auf der postulierten Intron-bereinigten cDNA-Sequenz von Klon MH6/1-8i1

<sup>2)</sup> beruht auf der cDNA-Sequenz von Klon MF7/3-1i2

<sup>3)</sup> beruht auf der cDNA-Sequenz von Klon MH5/1-1i1 und von Klon MF7/2-5i1

<sup>4)</sup> Accession no. Q9NL61 (Uniprot) bzw. BAA92809 (Genbank)

<sup>5)</sup> Accession no. Q9NL60 (Uniprot) bzw. BAA92810 (Genbank)

<sup>6)</sup> Accession no. Q9NL59 (Uniprot) bzw. BAA92811 (Genbank)

<sup>7)</sup> Expectation Value

Die Aminosäuresequenzen der drei potenziellen Isoformen des *M. sexta*-Annexin sind in den Abbildungen 39 bis 41 dargestellt.

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  MSGQQYYPYK CTPTVYPAEP FDPADAETL RKAMKGFSTD EKAIIDVLCR RGIVQRLEIA  60
61  ETFKTNYGKD LISELKSELS GNLENVIVAL MTPLPHFYAK ELHDAVAGLG TDEEAIIEIL 120
121 CTLSNYGIRT ISAFYEQLYN KSLESDLKGD TSGHFKRLCV SLCMANRDEN QGVDEGAARA 180
181 DAEALANAGE QWGTDESVE NSILITRSYQ QLRQIFAEFE ALTGKDIEES IKKEFSGSIE 240
241 KGMLAIVKCV KSKVGFFAER LYYSMKGLGT NDKTLIRIVV SRSEIDLGDI KQAFLDKYGK 300
301 PLESWIADDT SGDYKKALLT LVE

```

**Abb. 39:** Aminosäuresequenz der potenziellen *M. sexta*-Annexin IX-Isoform A (323 aa). Die Sequenz beruht auf der postulierten vollständigen Intronbereinigte Sequenz von Klon MH6/1-8i1; Isoform A spezifische Sequenz **rot** markiert

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  MSGQQYYPYK CTPTVYPAEP FDPADAETL RKAMKGFSTD EKAIIDVLCR RGIVQRLEIA  60
61  ETFKTNYGKD LISELKSELS GNLENVIVAL MTPLPHFYAK ELHDAVAGLG TDEEAIIEIL 120
121 CTLSNYGIRT ISAFYEQLYN KSLESDLKGD TSGHFKRLCV SLCMANRDEN QGVDEGAARA 180
181 DAEALANAGE QWGTDESVE NSILITRSYQ QLRQIFAEFE ALTGKDIEES IKKEFSGSIE 240
241 KGMLAIVKCV KSKVGFFAER LYYSMKGLGT NDKTLIRIVV SRSEIDLGDI KQAFLDKYGK 300
301 PLESWIAEDI GGPLGELLST MCY

```

**Abb. 40:** Aminosäuresequenz der potenziellen *M. sexta*-Annexin IX-Isoform B (323 aa), Klon MF7/3-1i2, Isoform B spezifische Sequenz **gelb** markiert



	1	11	21	31	41	51	
1	MSGQQYYPYK	CTPTVYPAEP	FDPAADAETL	RKAMKGFGTD	EKAIDVLCR	RGIVQRLEIA	60
61	ETFKTNYGKD	LISELKSELS	GNLENVIVAL	MTPLPHFYAK	ELHDAVAGLG	TDEEAIIEIL	120
121	CTLSNYGIRT	ISAFYEQLYN	KSLESDLKGD	TSGHFKRLCV	SLCMANRDEN	QGVDEGAARA	180
181	DAEALANAGE	GQWGTDESVE	NSILITRSYQ	QLRQIFAEFE	ALTGKDIEES	IKKEFSGSIE	240
241	KGMLAIVKCV	KSKVGFFAER	LYYSMKGLGT	NDKTLIRIVV	SRSEIDLGDI	KQAFLDKYGK	300
301	PLESWIADDL	TGDFRNVLVT	LCA				

**Abb. 41:** Aminosäuresequenz der potenziellen *M. sexta*-Annexin IX-Isoform C (323 aa), Klon MH5/1-1i1 und MF7/2-5i1, Isoform B spezifische Sequenz blau markiert

Das Ergebnis des Protein-Blasts der zwei restlichen ansequenzierten Klone (MF7/1-2i3 und MF8/1-1i2) ist in Tabelle B1 im Anhang dargestellt (siehe dort G04 bzw. G03).

### 3.4.4 Vergleichende Analysen der Sequenzdaten verschiedener Annexin IX-Klone von *M. sexta*

Ein Vergleich der drei vollständig sequenzierten Klone MH5/1-1i1, MH6/1-8i1 und MF7/3-1i2 (Abb. A6) ergab eine fast vollständige Übereinstimmung im Bereich vom Beginn der Klone (jeweiliges 5'-Ende) bis zur Position 983 von Klon MH5/1-1i1 und Klon MF7/3-1i2 bzw. Position 704 von Klon MH6/1-8i1 (in Abb. 32 – 34 schwarze Schrift). Daraufhin folgt bei Klon MH6/1-8i1 ein Bereich von 965 (567 + 398) Nukleotiden (nt), der bei keinem der anderen beiden Klone vorhanden ist (magenta und rot gefärbt in Abb. 33). Es schließt sich nun ein 351 nt langes Stück an (im Folgenden als „B-Teil“ bezeichnet und gelb markiert in Abb. 33 und 34), das sich sowohl in Klon MH6/1-8i1 (Position 1.672 - 2.020) als auch in Klon MF7/3-1i2 (Position 986 - 1.334) findet. Im Anschluss an dieses Sequenzstück folgt der letzte Teil der Sequenz (im Folgenden als „C-Teil“ bezeichnet und blau markiert in Abb. 32 – 34): bei Klon MH5/1-1i1 ab Position 984, bei Klon MH6/1-8i1 ab Position 2.021 und bei Klon MF7/3-1i2 ab Position 1.335. Letzterer befindet sich in der cDNA-Sequenz aller drei Klone. Einzelne Basen stimmen nicht immer bei allen Klonen überein. So steht z. B. bei Klon MH6/1-8i1 bei Basenposition 2.263 ein C, wohingegen bei den Klonen MH5/1-1i1 und MF7/3-1i2 an der passenden Basenposition ein A ist (siehe Abb. A6 im Anhang). Auch die Länge des PolyA-Schwanzes variiert in geringem Umfang.

Unter Berücksichtigung der Sequenzen der drei Isoformen des Annexin IX von *B. mori* (Alignment siehe Abb. A6) erkennt man, dass der Bereich von Klon MH6/1-8i1, der sich keinem der anderen beiden *M. sexta*-Klone zuordnen lässt, im

Teilbereich von Basenposition 1.272 bis Position 1.669 (im Folgenden „A-Teil“ genannt, in Abb. 33 rot markiert) gut zu einem entsprechenden Sequenzabschnitt der cDNA von *B. mori* Annexin IX-A (*Accession no.* AB030496) passt. Für den davor liegenden Teilbereich (Basenposition 705 bis 1.271 von MH6/1-8i1) konnte kein passender Sequenzabschnitt gefunden werden. Ein zusätzliches *Alignment* (Abb. A7 im Anhang) mit dem vollständigen Annexin IX-Gen von *B. mori* deutet auf ein Intron hin.

Ein *Alignment* der drei potenziellen Isoformen des *M. sexta* IX-Annexin mit denen von *B. mori* auf Aminosäureebene verdeutlicht die Übereinstimmung zwischen den Isoformen (Abb. A8 im Anhang).

Um weitere Indizien für die Identifizierung der drei vollständig sequenzierten Klone MH5/1-1i1, MH6/1-8i1 und MF7/3-1i2 als cDNA-Sequenz für potenzielle Isoformen eines putativen *M. sexta*-Annexin IX zu finden, wurden die Aminosäuresequenzen der drei potenziellen Annexin IX-Isoformen einer Motivsuche mit dem Programm „MyHits“ unterzogen. Das Vorhandensein der für Annexine charakteristischen Annexin-*Repeats* (Motiv: [TG]-[STV]-x(8)-[LIVMF]-x(2)-R-x(3)-[DEQNH]-x(7)-[IFY]-x(7)-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFA]-x(2)-[LIVMF]) konnte bestätigt werden. Sie liegen für alle drei potenziellen *M. sexta*-Annexin-Isoformen zwischen den Positionen 24 und 90, 96 und 162, 179 und 246, 255 und 321 (Ergebnisse der Suche in der Pfam - Datenbank über das Programm „MyHits“). Außerdem wurden Typ II Calcium-bindende Motive entsprechend Xia et al. (2001) in den Aminosäuresequenzen markiert (Abb. A9 im Anhang).

Das Programm „MyHits“ zeigte noch weitere Motive in der Sequenz an, deren Vorhandensein jedoch mit großen Unsicherheiten behaftet ist. So könnten sich folgende weitere Motive in der Sequenz des *M. sexta*-Annexin befinden (Abb. A10 im Anhang): (1) ein N-Glykosylierungsmotiv N-{P}-[ST]-{P} bei allen Isoformen (Aminosäureposition 140-143), (2) fünf Caseinkinase II Phosphorylierungsmotive [ST]-x(2)-[DE] für Isoform A, drei für Isoform B und C (Aminosäurepositionen [für Isoform B und C nur die ersten drei] 111-114, 223-226, 281-284, 310-313, 320-323), (3) vier Myristylierungsmotive G-{EDRKHPFY W}-x(2)-[STAGCN]-{P} bei Isoform A und C, fünf bei Isoform B (Aminosäurepositionen [für Isoform A und C nur die ersten vier] 81-86, 172-177, 191-196, 267-272, 311-316) und (4) fünf

Proteinkinase C Phosphorylierungsmotive [ST]-x-[RK] (Aminosäurepositionen 29-31, 62-64, 223-225, 230-232, 264-266). Alle Konsensus-Motive sind wie in der Prosite-Datenbank dargestellt (FALQUET et al. 2002). Außerdem wurde visuell ein KGD-Motiv (Aminosäureposition 148-150) gefunden. Die Unterschiede zwischen den Isoformen bezüglich des Caseinkinase II Phosphorylierungsmotivs und der Myristylierungsstellen liegt in den Isoform-spezifischen C-terminalen Sequenzabschnitten.

### **3.4.5 Charakterisierung des *M. sexta*-Annexin IX**

Zur Charakterisierung des *M. sexta*-Annexin IX wurde das Molekulargewicht, der Isoelektrische Punkt, das Vorkommen in Fettkörper und Hämozyten mittels Western Blot verifiziert sowie die Antikörperbindungsstelle theoretisch eingegrenzt. Es wurden mit verschiedenen Computerprogrammen Vorhersagen über die potenzielle Sekundärstruktur des *M. sexta*-Annexin IX und über das Vorhandensein von Signalsequenzen getroffen.

#### **3.4.5.1 Molekulargewichtsbestimmung und Ermittlung des Isoelektrischen Punktes**

Das Molekulargewicht von *M. sexta*-Annexin IX wurde mit ca. 33-34 k ermittelt (Western Blot in Kap. 3.4.5.2, Abb. 42).

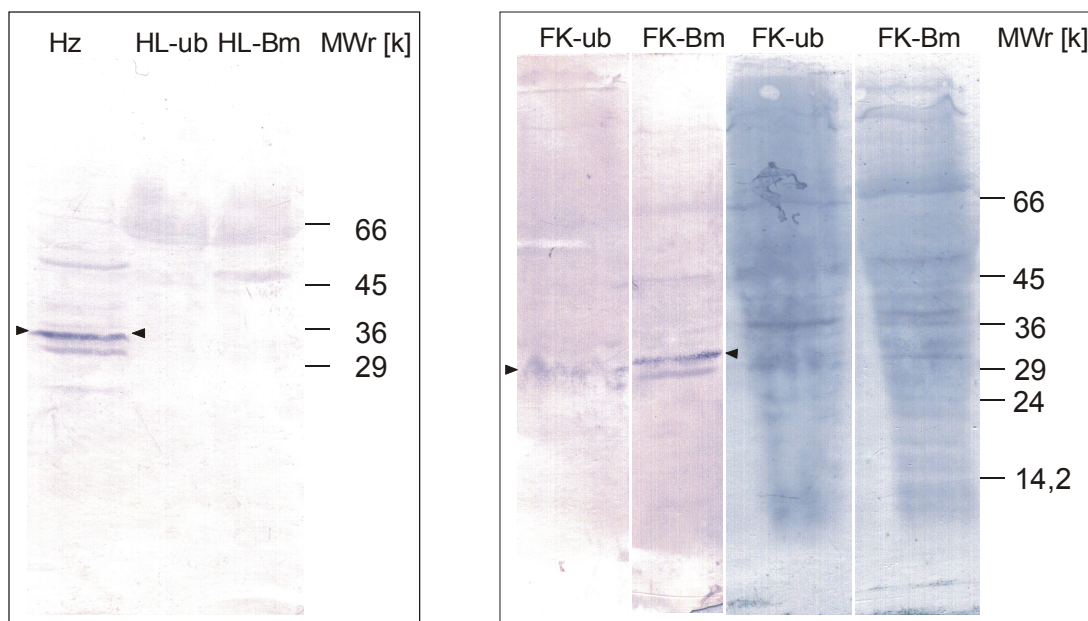
Das theoretisch ermittelte relative Molekulargewicht (aus der jeweiligen Aminosäuresequenz mit dem Programm „Compute pI/Mw“ beläuft sich für die potenzielle Isoform A des *M. sexta*-Annexin IX auf 35,8637 k, für Isoform B auf 35,79375 k und für Isoform C auf 35,84779 k.

Der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt liegt für die putative Isoform A bei 4,97, für Isoform B bei 4,90 und für Isoform C bei 4,94.

#### **3.4.5.2 Western Blot mit Hämozyten- und mit Fettkörperlysat**

Die Tatsache, dass zwei der Annexin IX-Klone aus der Hämozyten-Bank stammen und vier aus der Fettkörperbank sprach dafür, dass das *M. sexta*-Annexin IX sowohl in Hämozytenlysat als auch in Fettkörperlysat nachweisbar sein müssten. Wie in Abbildung 42 (links) dargestellt, ließ sich Annexin im Hämozytenlysat unbehandelter Larven nachweisen, nicht jedoch in der Hämolymphe von

unbehandelten Larven oder *B. megaterium*-injizierten Larven. Es war ebenfalls im Hämocytenlysat von *B. megaterium*-infizierten Larven nachweisbar (nicht gezeigt). Auch im Fettkörperlysat sowohl von unbehandelten Larven als auch von solchen, die eine *B. megaterium* Injektion erhalten hatten, konnte das Vorhandensein von Annexin IX mittels Western Blot verifiziert werden (Abb. 42 rechts). In Abbildung 42 ist unter der Annexin-Bande (Pfeilköpfe) eine weitere, schwächere Bande mit einem Molekulargewicht von knapp 31–32 k zu erkennen. Insbesondere beim Fettkörperlysat (Fk-Bm) ist die Annexin-Bande in der Probe des mit *B. megaterium* infizierten Tieres offenbar stärker als in der Probe der unbehandelten Larve.



**Abb. 42:** Nachweis von Annexin (► ◄) mit mAk MS#78 mittels Western Blot in Hämocyten- bzw. Fettkörperlysat von *M. sexta*-Larven L5d2–3.

Visualisierung mit Hilfe von BCIP/NBT; ganz rechts Amidoschwarzfärbung des Fettkörperlysats. FK-Bm = Fettkörperlysat bzw. (ca. 6,6 µl) bzw. HL-Bm = zellfreie Hämolymphe (ca. 0,9 µl) von Larven (24 h p. i.), denen *B. megaterium* injiziert worden war, FK-ub = Fettkörperlysat (ca. 6,6 µl) bzw. HL-ub = zellfreie Hämolymphe unbehandelter Larven (ca. 0,9 µl), Hz = Hämocytenlysat (ca. 30 µl) unbehandelter Larven, MW = relatives Molekulargewicht

### **3.4.5.3 Eingrenzung der potenziellen Antikörperbindungsstelle durch Sequenzvergleiche**

Aufgrund der Sequenzvergleiche der drei verschiedenen *M. sexta*-Annexin IX-Klone miteinander und mit Annexin IX von *B. mori* kann davon ausgegangen werden, dass bei *M. sexta* das Annexin betreffend die gleichen Prozessierungsmechanismen vorliegen (verschiedene Isoformen durch alternatives Spleißen am 3'-Ende der mRNA), d. h. dass sich die nahezu identischen Isoformen des Annexin IX nur in der kurzen Sequenz von 16 Aminosäuren am C-terminalen Region unterscheiden wie dies bei *B. mori* (16 bzw. 17 Aminosäuren) der Fall ist (Abb. A8 im Anhang).

Alle sechs *M. sexta*-Klone wurden mit dem gleichen monoklonalen Antikörper identifiziert. Ihre cDNA-Sequenzen sind aber jeweils unterschiedlich lang und auch nicht vollkommen identisch, da sie verschiedene Teilsequenzen entsprechend den unterschiedlichen Isoformen des Annexins besitzen. Für die Identifizierung der Antikörperbindungsstelle wurden zunächst die Sequenzen aller sechs Klone miteinander verglichen. Die vollständig sequenzierten Klone wurden als eine durchgehende Sequenz dargestellt. Die im Rahmen des EST-Projektes sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her ansequenzierten Klone wurden mit zwei Sequenzen aufgeführt (Abb. A5 im Anhang). Die Antikörperbindungsstelle muss dann in einem Bereich liegen, der von allen sechs Klonen kodiert wird.

Dieser Bereich, insgesamt 603 Basen, konnte auf die Sequenz zwischen Basenposition 102 und Position 704 bezogen auf die cDNA von Klon MH6/1-8i1 (Abb. A5 im Anhang) eingegrenzt werden. Dieser Sequenzbereich ist in den cDNA-Sequenzen aller sechs Klone enthalten. Die Aminosäuresequenz der Antikörperbindungsstelle umfasst insgesamt 201 Aminosäuren (Position 107 bis 307 bezogen auf Isoform A des *M. sexta*-Annexins, Abb. A8 im Anhang).

### **3.4.5.4 Überprüfung der *M. sexta*-Annexin IX-Sequenz auf das Vorhandensein eines Signalpeptids**

Eine Überprüfung der ersten 70 Aminosäuren des *M. sexta*-Annexins mit dem Programm „SignalP 3.0“ wiesen nicht auf das Vorhandensein von Signalpeptiden hin.

#### **3.4.5.5 Voraussage über das Vorhandensein von $\alpha$ -Helices**

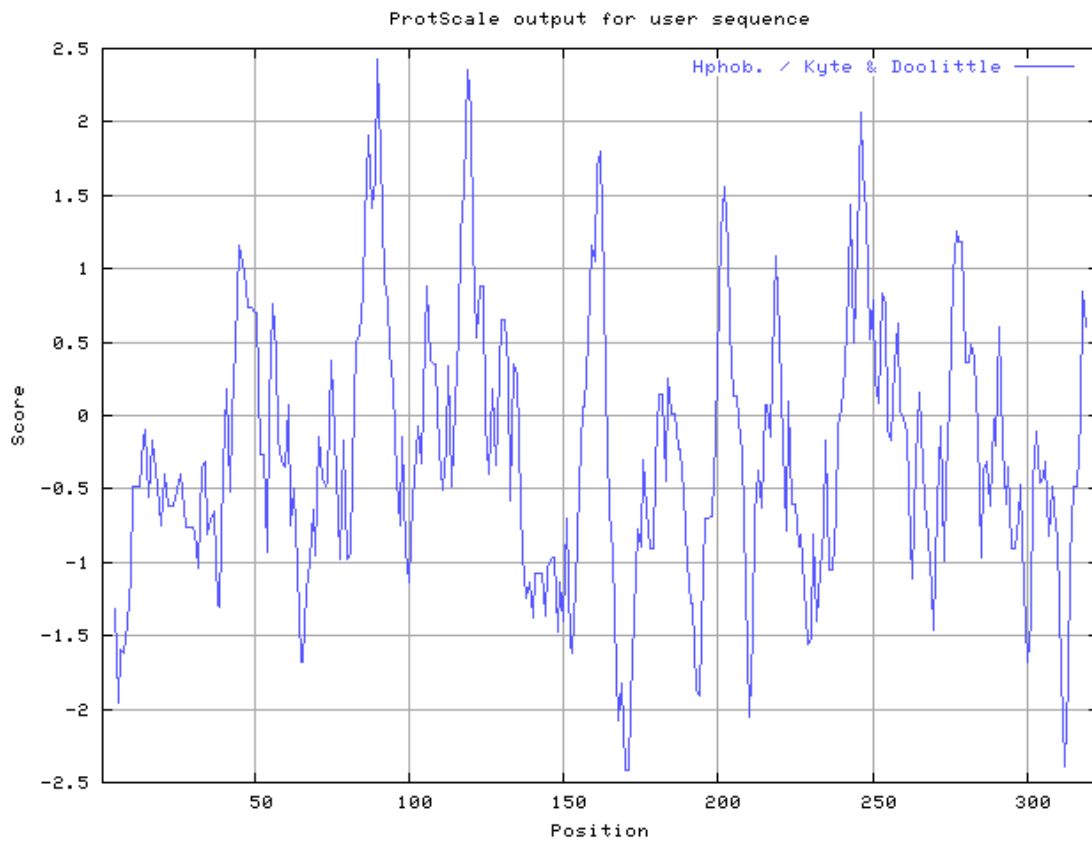
Voraussagen über die Struktur des *M. sexta*-Annexin IX wurden mit dem Programm „PSIPRED“ Version 2.3 getroffen und ergaben das Vorhandensein von 20  $\alpha$ -Helices, unterbrochen von kurzen so genannten „coil“-Abschnitten. Sie liegen überwiegend in den Bereichen der Annexin-*Repeats*.  $\beta$ -Faltblattstrukturen wurden nicht vorhergesagt (Abb. A9 im Anhang).

#### **3.4.5.6 Untersuchungen zur Hydrophobizität und zum Vorhandensein von Transmembranbereichen**

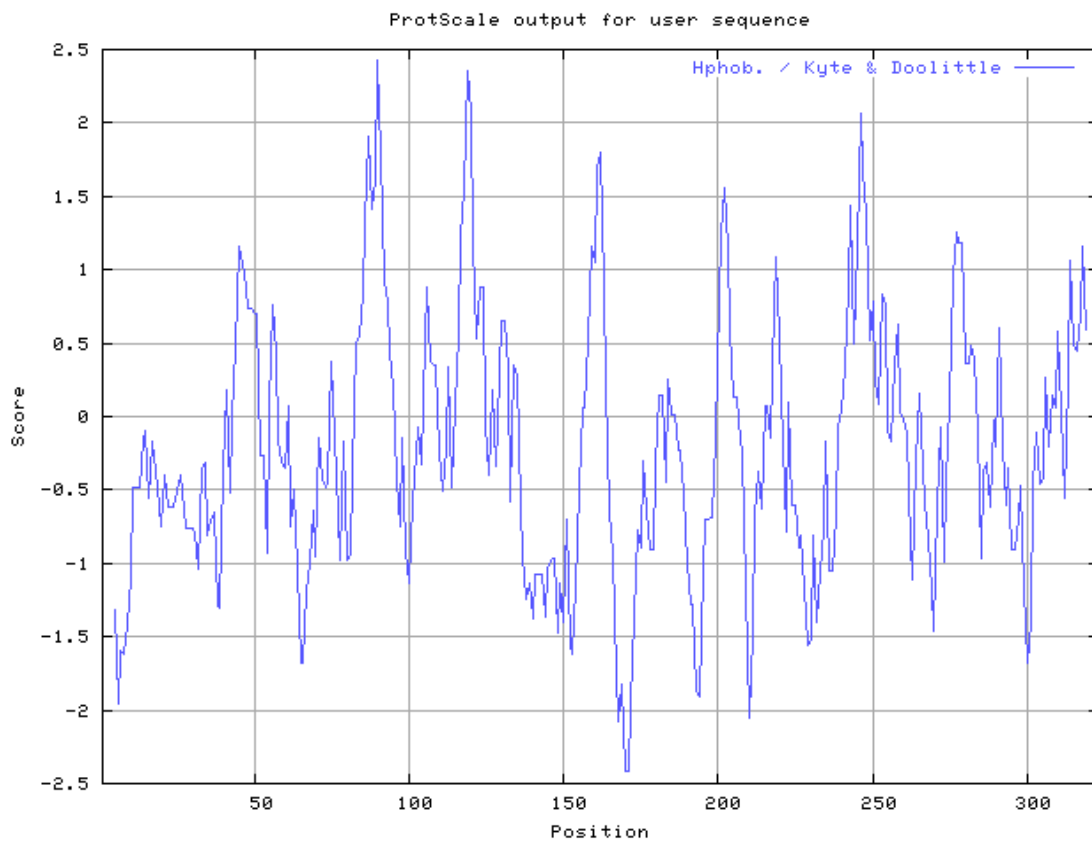
Die Analyse (Programm „ProtScale“ des Expasy-Servers) der *M. sexta*-Annexin IX-Sequenz auf das Vorhandensein stark hydrophiler bzw. hydrophober Bereiche nach KYTE & DOOLITTLE (1982) zeigen ein abwechselndes Muster (Abb. 43) von hydrophoben (positive Werte auf der Y-Achse) und hydrophilen Bereichen (negative Werte). An keiner Stelle gibt es ausgedehnte hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche. Im Bereich der letzten 16 Aminosäuren, in denen sich die drei Isoformen unterscheiden, treten Unterschiede auf: Bei Isoform A und C sind negative Bereiche (hydrophil) zu erkennen, die zum Schluss aber wieder in den positiven Bereich (hydrophob) wechseln. Der Peak bei Isoform A ist deutlich stärker ausgeprägt (negativer) als bei Isoform C. Bei Isoform B bewegt sich die Kurve um den Nullwert mit einer leichten Tendenz zu positiven Werten hin und weist keine ausgeprägten Spitzen auf. Zusammenfassend bedeutet dies, dass der Unterschied zwischen den drei *M. sexta*-Annexin IX-Isoformen in der Hydrophobizität des C-terminalen Region der Aminosäuresequenzen liegt. So besitzen Isoform A und C eher ein hydrophiles C-terminales Ende (bei Isoform C weniger stark ausgeprägt) mit einem kleinen leicht hydrophoben Schwanz. Isoform B hingegen besitzt C-terminal ein eher neutrales Ende mit leicht hydrophober Tendenz.

Die Vorhersage über das potenzielle Vorhandensein von Transmembranbereichen des *M. sexta*-Annexin IX mittels „MEMSAT“ über das Programm „PSIPRED“ fiel negativ aus. Für keine der drei Isoformen wurden Transmembran-Helices vorausgesagt.

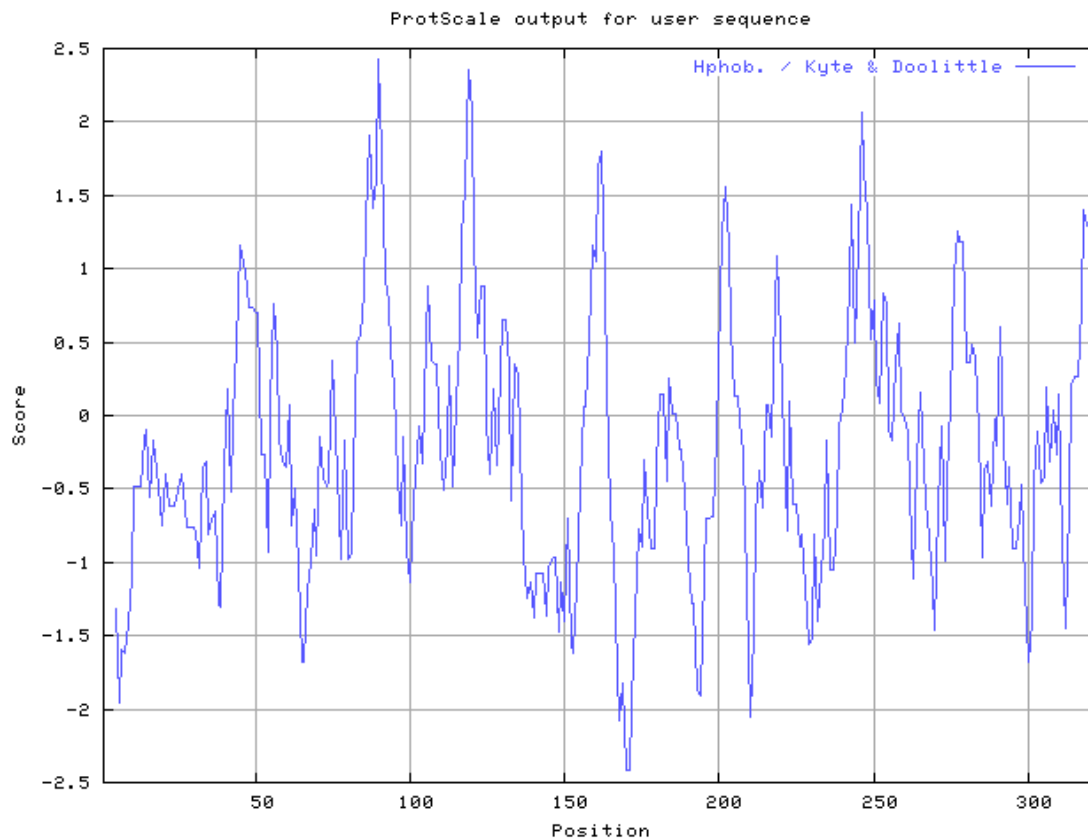
a.



b.



c.



**Abb. 43:** Hydrophobizitätskurven nach KYTE & DOOLITTLE (1982) für die Aminosäuresequenzen des *M. sexta*-Annexin IX (a. Isoform A, b. Isoform B, c. Isoform C)

### 3.4.5.7 Untersuchung der putativen Isoform A des *M. sexta*-Annexin IX auf Exon-Intron-Spleißstellen bzw. solche für alternatives Spleißen

Bei der in Kapitel 3.4.4 erwähnten Teilsequenz von 567 Nukleotiden aus Klon MH6/1-8i1 (magenta markiert in Abb. 33), zu der kein passendes Sequenzstück in anderen *M. sexta*-Klonen bzw. in den drei *B. mori*-Annexin-Isoformen gefunden wurde, könnte es sich um ein Intron handeln (*Alignment* in Abb. A7 im Anhang).

Es stellte sich heraus, dass die Konsensussequenzen (LODISH et al. 2001) für Exon-Intron-Spleißstellen auch hier vorhanden sind, d. h. auf die 5'-Spleißstelle folgend beginnt die cDNA des Introns mit den Basen 5'-GT und ebenfalls die nächstfolgenden Intronpositionen 3 bis 6 stimmen mit der Konsensussequenz überein (AAGT). Auch vor der 3'-Spleißstelle ist die Sequenz des Introns (CAG-3') mit der Konsensussequenz identisch.

Die Untersuchung weiterer putativer Spleißstellen, die für das alternative Spleißen der verschiedenen Isoformen genutzt werden, ergab, dass sowohl die Isoform A-spezifische Nukleotidsequenz (in Abb. 44 rot) als auch die Isoform B-spezifische



Sequenz (gelb) am 3'-Ende auf CAG-3' enden entsprechend der Konsensussequenz der 3'-Spleißstellen eines Introns. Eine Ausnahme stellt das 3'-Ende der allen Isoformen gemeinsamen Teilsequenz dar, das auf GCT-3' endet. Alle Teilsequenzen beginnen nach einer potenziellen Spleißstelle mit 5'-G.

---

**Abb. 44:** (folgende Seite): Nukleotid- und Aminosäuresequenz der *M. sexta*-Annexin IX Isoform A. Grün markiert ist die postulierte Teilsequenz, rot, gelb bzw. blau markiert sind die für die Isoformen A, B bzw. C spezifischen Sequenzen, die bei der Translation eine Rolle spielen. Putative Spleißstellen ▼ sind markiert. Die Aminosäuresequenzen der Isoformen sind in den Farben der entsprechenden Nukleotidsequenzen dargestellt, wobei am C-terminalen Ende der Sequenz Isoform A nur aus den rot markierten Aminosäuren besteht, Isoform B dementsprechend nur aus den gelb markierten Aminosäuren und Isoform C nur aus den blau markierten Aminosäuren. Allen Isoformen gemeinsam ist die N-terminale schwarz markierte Sequenz (inkl. Startcodon) und die 5'-nichttranslatierte Region. Die 5'-UTR ist lila und das Startcodon für die Translation ist braun markiert. Das für die jeweilige Translation entscheidende Stoppcodon \* ist in den den Isoformen entsprechenden Farben gekennzeichnet. Die Sequenzbereiche für Forward und den Reverse Primer für die PCR (Kap. 2.2.20.2) sind unterstrichen. Abweichend von der üblichen Konvention beginnt hier die Zählung der Nukleotide mit dem 1. Nukleotid im 5'-UTR.

	1	11	21	31	41	51	
1	CGGAATTCGC	TCCGTACAAG	TGAGGTTGGG	TGTGTCGCTA	ATTTACAAAA	GAATCTTTCA	60
61	ACATGAGCGG	ACAACAGTAC	TACCCCTATA	AGTGCACCCC	CACGGTGTAC	CCCGCGGAGC	120
1	M S G	Q Q Y	Y P Y	K C T P	T V Y	P A E	19
121	CTTTCGACCC	CGCGGCGGAT	GCGGAGACCC	TCCGCAAGGC	TATGAAAGGG	TTTGGCACCG	180
20	P F D P	A A D	A E T	L R K A	M K G	F G T	39
181	ACGAGAAGGC	CATCATCGAC	GTCCTTTGCC	GCCGCGGTAT	CGTCCAGCGT	CTGGAGATCG	240
40	D E K A	I I D	V L C	R R G I	V Q R	L E I	59
241	CCGAAACTTT	CAAGACTAAC	TATGGCAAGG	ACCTCATCAG	CGAGTTGAAG	AGCGAACTGA	300
60	A E T F	K T N	Y G K	D L I S	E L K	S E L	79
301	GCGGCAACTT	GGAGAACGTC	ATCGTTGCGC	TGATGACCCC	CCTGCCACAC	TTCTACGCTA	360
80	S G N L	E N V	I V A	L M T P	L P H	F Y A	99
361	AGGAACTGCA	CGACGCCGTC	GCGGGACTCG	GTACCGACGA	GGAGGCGATC	ATTGAGATCC	420
100	K E L H	D A V	A G L	G T D E	E A I	I E I	119
421	TGTGCACACT	CTCAAACCTAC	GGCATCCGCA	CCATCTCAGC	TTTCTACGAA	CAATTATACA	480
120	L C T L	S N Y	G I R	T I S A	F Y E	Q L Y	139
481	ACAAGAGCTT	GGAATCGGAT	CTGAAAGGCG	ACACATCTGG	CCACTTCAAG	AGGCTGTGTG	540
140	N K S L	E S D	L K G	D T S G	H F K	R L C	159
541	TTTCCCTATG	TATGGCCAAC	CGTGATGAGA	ACCAGGGTGT	GGACGAAGGC	GCCGCTAGGG	600
160	V S L C	M A N	R D E	N Q G V	D E G	A A R	179
601	CTGACGCTGA	GGCCCTGGCC	AACGCCGCGC	AGGGACAATG	GGGCACCGAC	GAGTCCGTCT	660
180	A D A E	A L A	N A G	E G Q W	G T D	E S V	199
661	TCAACTCTAT	TCTTATCACA	CGATCCTACC	AACAGCTGAG	ACAGATATTC	GCTGAATTCTG	720
200	F N S I	L I T	R S Y	Q Q L R	Q I F	A E F	219
721	AGGCGTTGAC	TGGAAAGGAC	ATCGAAGAAT	CTATCAAGAA	GGAATTCTCT	GGAAGCATCG	780
220	E A L T	G K D	I E E	S I K K	E F S	G S I	239
781	AGAAGGGCAT	GCTTGCTATT	GTGAAATGCG	TAAAGAGCAA	GGTTGGTTTC	TTCGCTGAGC	840
240	E K G M	L A I	V K C	V K S K	V G F	F A E	259
841	GCCTGTACTA	TTCCATGAAA	GGGCTCGGTA	CAAATGATAA	GACCCTCATC	AGAATCGTGG	900
260	R L Y Y	S M K	G L G	T N D K	T L I	R I V	279
901	TCAGCCGCTC	CGAGATCGAC	CTCGGGGACA	TCAAACAGGC	ATTCCCTTGAC	AAATACGGCA	960
280	V S R S	E I D	L G D	I K Q A	F L D	K Y G	299
			▼				
961	AGCCCCTGGA	GAGCTGGATC	GCTGACGACA	CTTCCGGGGA	TTACAAGAAG	GCTTTATTGA	1020
300	K P L E	S W I	A D D	T S G D	Y K K	A L L	319
1021	CCCTAGTCGA	ATAAATTGTG	TGGTTCCCGA	ATGGTCAGGA	TCACTATGGT	TGATATCCAC	1080
320	T L V E	*					
1081	CTATCTCGAA	TATTTTAAGT	TTTTTTTTTG	TCAATTTGCT	AGATTATTAA	GACAGTTAGG	1140
1141	GCTTGACGGC	CGATCGTAAA	GTAACAACAG	CACAACGCTA	GTCTAGACGT	TCGCGGTTCGT	1200
1201	CGGGTGTGCT	AGGTTATCGT	GAGATGTAAA	TTTATTTGAG	ATCTGTATAG	TTCGCTTGTG	1260
1261	AGCACGGTCC	CGGTCATGTA	ACTCTTCCGT	AGCTAACAGC	TTTATGTGTC	GCGCTCGTGC	1320
1321	ACGAGGGTAA	CGGTTCTCTA	TTAGTTTTGC	TTAGTTTTAC	AAGTAGTTGT	TGGTTTTTCA	1380
			▼				
1381	GGAGGACATA	GGAGGTCCGC	TCGGCGAACT	CCTATCAACA	ATGTGTTACT	AAAGCCTACA	1440
308	E D I	G G P	L G E L	L S T	M C Y	*	
1441	CTGCTATAAC	ATTAACACTC	AGTATTACGA	GCGCCATTCC	GTTATACGCC	AACGCAGTGT	1500
1501	CAAGTAAAGC	AAACTATTTA	TTGCATCTAT	TGTACCCGAG	TACACTTATG	TGCATTTTAA	1560
1561	AGACATTATA	TAATTAATTT	AAGCTATTTA	ATCATTGTGA	TTTCCATTCT	CATGTATAGT	1620
1621	CAGAACCAAG	AATGCACGTT	TGAAGTTTGA	GCGCAGTGGT	TTGAACATATG	GGCCAGTTTA	1680
						▼	
1681	TTTTGTTTCG	TAACATGTGA	AGCGTGAGCG	CGTTTTCCGC	TGTTGTTTAC	AGGATGACCT	1740
308						D D L	310
1741	GA CTGGTGAC	TTCAGGAATG	TGCTAGTCAC	ACTTTGTGCT	TAACCCTGCA	ATACATTAGA	1800
311	T G D	F R N	V L V T	L C A	*		
1801	GCTGTTATTT	TTATATGAAT	ATTTGGTTAA	GCTTAGCATG	TTGTTGCGGA	ACGCTACAAA	1860
1861	GTACAATAAT	GGTTTGCAGG	ACGATACGAA	GGGCGACTTC	AAACACGCGT	TACTGACCCCT	1920
1921	AGTGTCTGTAG	GGACGCATAC	GCATTATACT	GCAGACCGAT	AGACATGCCT	TTGACCCGTA	1980
1981	TA ACTGTTAA	GAGATGTTTA	GAAATTAAAG	CTTGATATTT	TTGTGAAAAT	GAGATATTTA	2040
2041	TTGGTGCTGT	ACTTTTGTTC	ACATTATACA	TATTTACATT	ATAATTATTA	AATCACACTA	2100
2101	TTATGTATGT	TAAAAAGAGA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA		

### **3.4.6 Immunhistologischer Nachweis von Annexin IX in verschiedenen Geweben von *M. sexta***

Es wurde über den bereits durchgeführten Western Blot mit Hämozyten- bzw. Fettkörperlysat hinaus untersucht, in welchen Geweben von *M. sexta* sich Annexin IX immunhistologisch nachweisen lässt, insbesondere im Hinblick auf Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Larven.

#### **3.4.6.1 Nachweis von Annexin IX in Hämozyten**

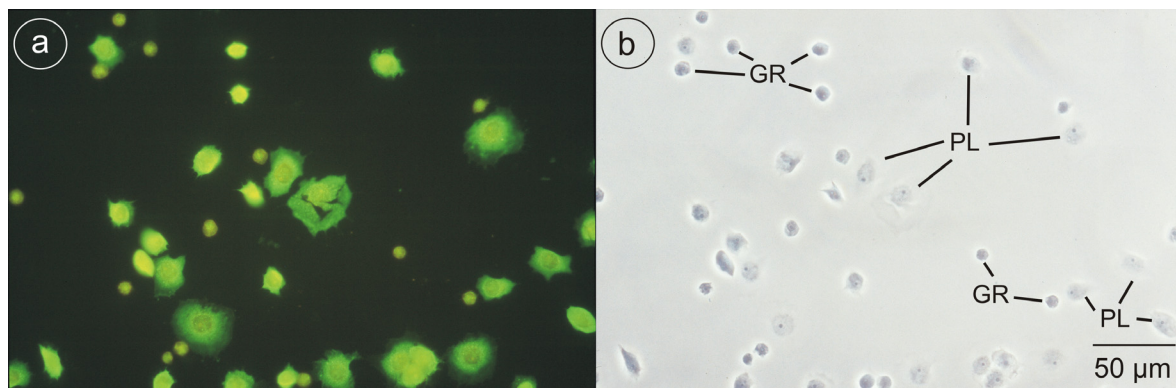
Wie in Kapitel 3.4.5.2 beschrieben konnte Annexin IX im Lysat von Hämozyten mittels des Western-Blot-Verfahrens nachgewiesen werden. Es sollte nun geklärt werden, bei welchen Hämozytentypen im einzelnen und mit welchem spezifischen Verteilungsmuster Annexin dort vorkommt. Gleichzeitig wurden dabei Vergleiche zwischen Hämozyten unbehandelter und mit Bakterien infizierter Larven angestellt. Ebenso wurden Hämozyten, die *in vitro* Hefezellen phagozytiert hatten, mit solchen, die dies nicht hatten, verglichen.

##### **3.4.6.1.1 Vergleich von Hämozyten-Monolayern unbehandelter *M. sexta*-Larven mit solchen, denen *B. megaterium* injiziert worden war**

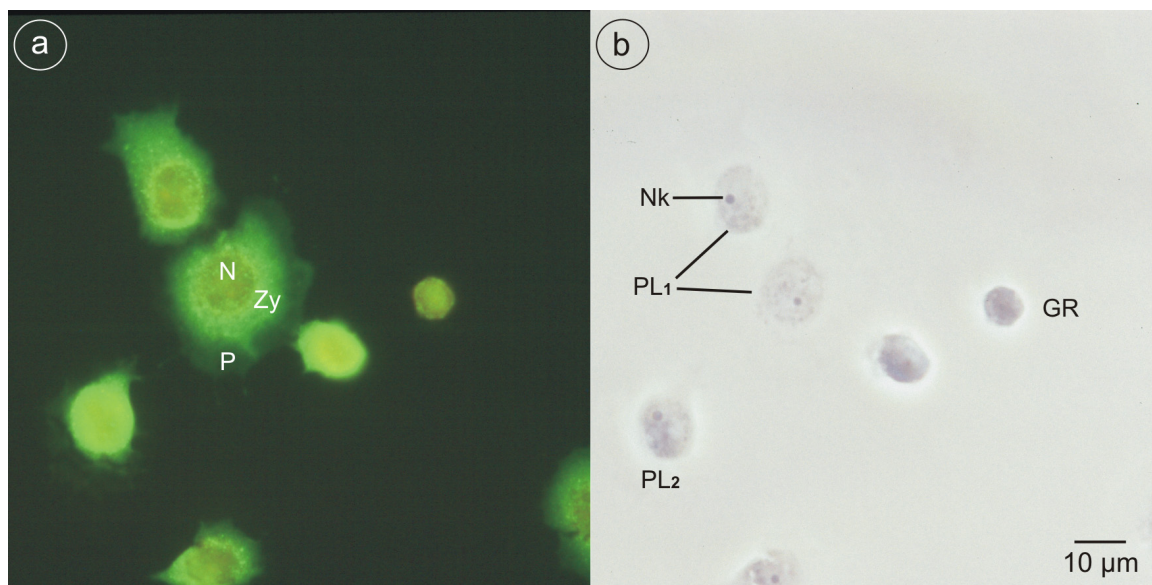
Die Hämozyten-Monolayer der mit *B. megaterium* bzw. *M. luteus* injizierten L5d2-3 Larven wurden nach dem in Kapitel 2.2.8.1 beschriebenen Verfahren angefertigt. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden zwei verschiedene sekundäre Antikörper verwendet, ein FITC-markierter und ein Cy3-markierter anti-Maus Antikörper, verwendet.

Der anti-Annexin mAk (MS#78) zeigte kein eindeutig unterschiedliches Bindungsmuster zwischen den verschiedenen Hämozytentypen (Abb. 45), wenn auch die Markierung der Granulären Zellen etwas schwächer war als die der Plasmatozyten oder der Oenozytoide. Das Antigen konnte jeweils im Zytoplasma der Hämozyten und deutlicher in der Membran nachgewiesen werden (Abb. 47 a und c). Insbesondere bei gespreiteten Plasmatozyten wurde ein gesprenkeltes Verteilungsmuster des Antigens im Zytoplasma bzw. auf der Zellmembran deutlich (Abb. 46). Die Pseudopodien hingegen wurden schwächer markiert. Es konnte mit den angewendeten Methoden kein

kein Unterschied im Markierungsmuster zwischen den Hämozyten unbehandelter und *M. luteus* bzw. *B. megaterium* infizierter Larven festgestellt werden (Abb. 47). Einzig Sphärule Zellen, die nur bei Larven, denen *M. luteus* injiziert wurde, gehäuft auftraten, scheinen sehr einheitlich mit MS#78 markiert worden zu sein (Abb. 47 c und d).

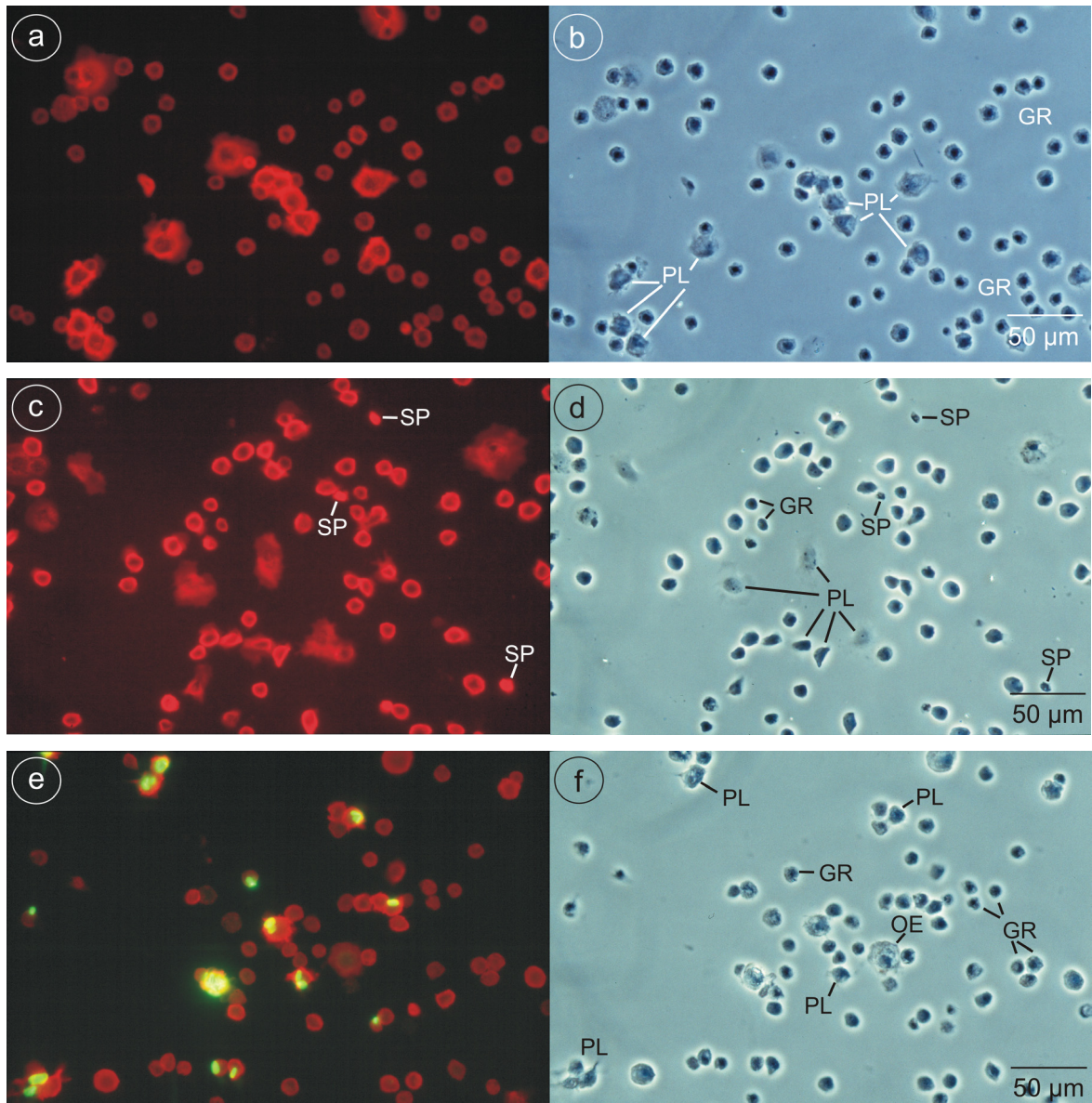


**Abb. 45:** Übersichtsaufnahme von Hämozyten-Monolayern unbehandelter *M. sexta* L5d2–3 markiert mit MS#78 und indirekter Immunfluoreszenz (FITC-konjugiert). **a.** Fluoreszenzaufnahme **b.** Phasenkontrastaufnahme. GR = Granuläre Zellen, PL = Plasmatozyten



**Abb. 46:** Plasmatozyten (PL) und Granuläre Zellen (GR) auf Hämozyten-Monolayern von unbehandelten *M. sexta* L5d2-3 markiert mit MS#78 und indirekter Immunfluoreszenz (FITC-konjugiert). Bei den gespreiteten Plasmatozyten (PL<sub>1</sub>) wird im Gegensatz zu den nicht gespreiteten (PL<sub>2</sub>) ein gesprenkeltes Markierungsmuster im Zytoplasma (Zy) und auf der Zellmembran, die sich auch über den Zellkern (N) mit Nukleolus (Nk) erstreckt, deutlich. Die Pseudopodien sind sehr viel schwächer markiert. **a.** Fluoreszenzaufnahme **b.** Phasenkontrastaufnahme





**Abb. 47:** Vergleich zwischen Hämozyten-Monolayern unbehandelter *M. sexta* L5d2-3 (a und b, Verwendung von Triton) und Larven, denen *M. luteus* (c und d 24 h p. i., Verwendung von Triton) bzw. FITC-markierter *B. megaterium* (e und f 6 h p. i.) injiziert wurde. Die Hämozyten sind mit MS#78 und indirekter Immunfluoreszenz (Cy3-konjugiert) markiert. Plasmatozyten (PL), Granuläre Zellen (GR) und Oenozytoide (OE) sind in allen drei Präparaten gleichartig von MS#78 markiert. Sphärule Zellen (SP) traten nur bei *M. luteus* infizierten Larven gehäuft auf (c und d) und unterscheiden sich in ihrem Markierungsmuster nicht grundlegend von den anderen Zelltypen. a, c, e. Fluoreszenzaufnahmen b, d, f. Phasenkontrastaufnahmen

#### **3.4.6.1.2     *Hämozyten-Monolayer nach Phagozytose von Hefe (in-vitro-Phagozytose-Assay)***

Das mikroskopische Bild der Hämozyten-Monolayer nach Phagozytose von Hefe glich dem der anderen Hämozyten-Monolayer (siehe Kap. 3.4.6.1.1).

Es ließ sich kein Unterschied zwischen Hämozyten, die Hefe phagozytiert hatten und solchen, die nicht phagozytiert hatten, im Markierungsmuster des monoklonalen Antikörpers MS#78 feststellen.

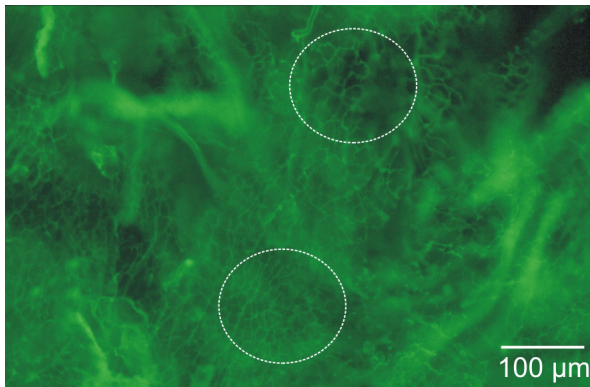
#### **3.4.6.2        *Nachweis von Annexin IX in anderen Geweben***

Zum Nachweis von Annexin IX in Geweben von *M. sexta* Larven wurden sowohl *Whole-mount*-Präparate von Fettkörper, Integumentinnenseite und Darmepithel angefertigt als auch Ganztierschnitte von unbehandelten bzw. parasitierten Larven verwendet. Sie wurden immunhistologisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MS#78 auf das Vorhandensein von Annexin untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene sekundäre Antikörper verwendet, zum einen ein FITC-gekoppelter zum anderen ein Cy3-gekoppelter anti-Maus Antikörper.

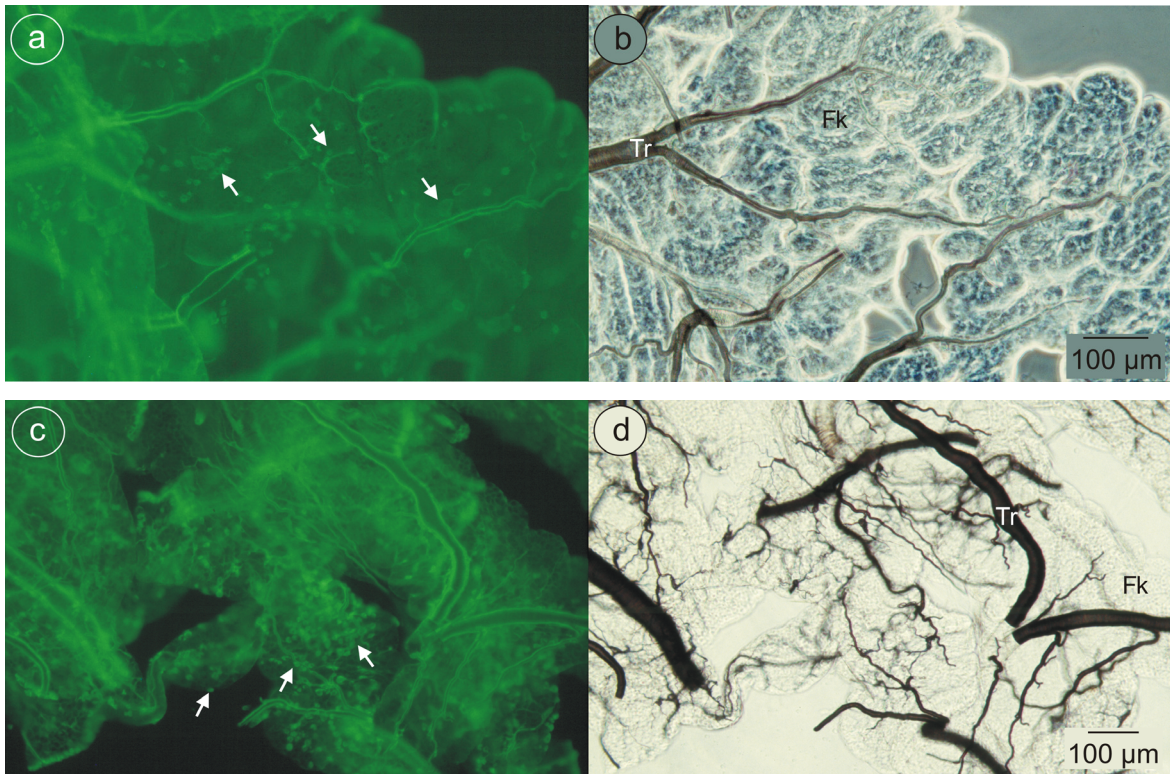
##### **3.4.6.2.1     *Whole-mount-Präparationen von Fettkörper, Integumentinnenseite und Darmepithel***

Alle drei untersuchten Organe bzw. Gewebe zeigten eine farbintensive Fluoreszenzmarkierung. Die Kontrollen waren negativ oder zeigten eine deutlich schwächere Farbintensität. Im Allgemeinen konnte jedoch bei den einzelnen Zellen der Organe kein spezifisches Markierungsmuster festgestellt werden. Einzig die Membran der Fettkörperzellen wies eine etwas stärkere Markierung auf als das Zellinnere (Abb. 48). An den Fettkörper bzw. das Integument anhängende Tracheen wiesen eine starke Eigenfluoreszenz auf.

Es war kein Unterschied feststellbar zwischen der Markierung der Fettkörperzellen von unbehandelten Larven und denen von mit *B. megaterium* infizierten Larven (Abb. 49) sowie solchen Fettkörperzellen, die in der Nähe der Injektionsstelle am Integument lagen. Die Präparate, die mit Triton behandelt waren, wiesen ebenfalls keinen Unterschied zu denjenigen auf, die nicht mit Triton behandelt wurden.



**Abb. 48:** *Whole-mount*-Präparat des Fettkörpers einer unbehandelten *M. sexta* (L5d2–3) nach Markierung mit MS#78 und indirekter Immunfluoreszenz (FITC-konjugiert). Besonders im gekennzeichneten Bereich wird deutlich, dass die Zellmembran der Fettkörperzellen intensiver markiert ist als das Zellinnere. (Fluoreszenzaufnahme)



**Abb. 49:** *Whole-mount*-Präparate des Fettkörpers (Fk) einer unbehandelten *M. sexta* L5d2–3 (a und b, Verwendung von Triton) und einer mit *B. megaterium* infizierten *M. sexta* L4\*–L5d0 (24 h p. i.) (c und d) nach Markierung mit MS#78 und indirekter Immunfluoreszenz (FITC-konjugiert). Die Kutikula der Tracheen (Tr) weist eine starke Eigenfluoreszenz auf. Während der Fettkörper eine gleichmäßige Markierung zeigt, treten an den Fettkörper angelagerte Hämocyten (Pfeile) deutlich hervor. Ein gravierender Unterschied zwischen den Präparaten im Markierungsmuster ist nicht zu erkennen. **a.** und **c.** Fluoreszenzaufnahmen, **b.** und **d.** Phasenkontrastaufnahmen



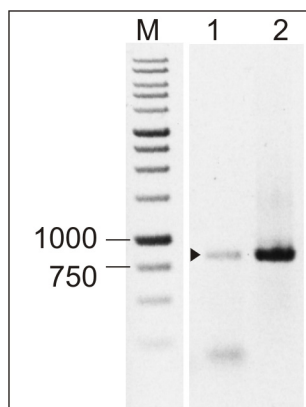
### 3.4.6.2.2 Nachweis von Annexin IX auf Ganztierschnitten

Hier wurde der Frage nachgegangen, ob und welche Strukturen in der *M. sexta*-Larve mit dem monoklonalen Antikörper MS#78 markiert werden. Dabei wurden Schnitte verwundeter (mit steriler Kanüle angestochener) Larven, mit *Cotesia glomerata* parasitierter und unbehandelter Larven verwendet.

Zwischen den Schnitten der verschiedenen Larven waren keine Unterschiede im Bindungsmuster des Antikörpers zu erkennen. Grundsätzlich waren alle Strukturen gleich markiert, nur bei den chitinösen Strukturen wie z. B. der Kutikula und z. T. der dem Darmepithel aufliegenden Peritrophischen Membran war die Fluoreszenz etwas intensiver. Wobei diese geringfügig höhere Farbintensität bei Schnitten von verwundeten und den parasitierten Larven noch etwas stärker ausfiel im Vergleich zu Schnitten von unbehandelten Larven. Insgesamt lag wieder eine relativ starke Eigenfluoreszenz vor.

## 3.5 Ampifizierung eines Sequenzabschnitts im C-Terminus des Annexin IX-Gens aus Hämozyten von *M. sexta*

Mit der Amplifizierung eines Sequenzabschnitts im C-Terminus des Annexin IX-Gens aus Hämozyten von *M. sexta* wurde überprüft, ob sich in der genomischen DNA (1) Introns zwischen den Isoform-spezifischen Sequenzabschnitten befinden. und ob (2) tatsächlich nur eine Gensequenz für alle drei Isoformen von Annexin IX existiert. Es wurde nur ein PCR-Produkt mit einer Länge von 801 bp erwartet, wenn (1) die genomische DNA der cDNA in diesem Bereich gleich und keine Introns vorhanden sind und wenn (2) keine weiteren Gensequenzen für Annexin IX vorhanden sind.



**Abb. 50:** Amplifikation eines 800 bp-Fragments (Pfeilkopf) aus genomischer DNA von *M. sexta*-Larven (Spur 1). Spur 2: cDNA von Klon MH6/1-8i1. Marker (M): 1 kb DNA Ladder (Gene Craft)



In einem ersten Schritt gelang die Amplifikation eines etwa 800 bp langen DNA-Fragments (Abb. 50). Eine weitere Vervielfältigung des PCR-Produkts, um es sequenzieren zu lassen, gelang jedoch nicht.

### **3.6 Ergebnisse des EST-Projekts**

Mit dem EST-Projekt sollte die Hämozyten-cDNA-Expressionsbank durchsucht werden, um einen Einblick darüber zu erhalten, welche Klone in der Bank enthalten sind und damit möglicherweise auf Klone zu stoßen, die cDNA-Sequenzen enthalten, welche für Proteine kodieren, die bekanntermaßen an verschiedenen Abwehrprozessen beteiligt sind. Eine Identifizierung der Klone erfolgte durch Vergleiche der Sequenzen mit Datenbankeinträgen (WU-BLAST2, EMBL) auf Nukleotid- und auf Aminosäureebene (Ergebnisse der Sequenzvergleiche siehe Tab. B1 in Anhang B).

Insgesamt konnten von 90 Klonen mindestens 62 Klone als potenziell kodierende Gensequenzen erfasst werden. Von diesen wiederum kodieren (1) drei Klone (A02, G07, G12) für antimikrobielle Peptide, wie Gloverin, Lysozym und Attacin, (2) zwei Klone (G11, H07) für Proteine, die im Zusammenhang mit Adhäsionsmechanismen von Bedeutung sein können, wie z. B. Hämozytin oder Lakunin, sowie (3) drei Klone (B02, D05, E08) für Proteine, die an Abwehrprozessen beteiligt sind, wie beispielsweise die Phenoloxidase. Interessant ist allerdings auch, dass einige Klone (4) evtl. für Hormone bzw. hormonbindende Proteine kodieren.

## 4. Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst Ergebnisse zur Analyse der Provokatorkompetenz von Bakterien und bakteriellen Komponenten diskutiert. Es schließt sich eine Erörterung der Lyse von Bakterien in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven und der Verlauf der Phagozytose von *B. megaterium* durch Hämocyten an. Erste Untersuchungen zur Isolierung eines potenziellen *peptidoglycan recognition proteins* bzw. Peptidoglykan-Bindungsproteins aus der Hämolymphe und mittels eines molekularbiologischen Ansatzes aus Hämocyten und Fettkörper werden besprochen. Zum Schluss wird das für *M. sexta* neu entdeckte Annexin IX diskutiert, welches über das Screening der cDNA-Banken gewonnen wurde und die Ergebnisse des EST-Projekts werden kurz erläutert.

### 4.1 Provokatorkompetenz von Bakterien und isolierten bakteriellen Komponenten zur Auslösung einer Immunantwort bei *M. sexta*

Um vergleichende Untersuchungen zwischen infizierten und unbehandelten Tieren anstellen zu können, wurden definierte Provokatoren ausgewählt werden, die eine Immunantwort bei den Larven (L5) von *M. sexta* hervorriefen.

Die auftretenden Nebeneffekte der Injektionen mit Bakterien bzw. bakteriellen Oberflächenkomponenten, die z. T. schon wenige Stunden nach der Injektion sichtbar wurden, waren verminderte bis keine Futteraufnahme bzw. Gewichtszunahme, eine Melanisierung der Hämolymphe und des Integuments direkt um die Injektionsstelle bis hin zu größeren Bereichen sowie ein „Schlaffwerden“ der Tiere. Ähnliche Beobachtungen wie vermindertes Fressen und Wachstum, veränderte Exkretion und verspätete Metamorphose wurden bei *M. sexta* auch von DUNN et al. (1994) beobachtet und als „Malaise-Syndrom“ bezeichnet.

#### 4.1.1 Überprüfung der Provokatorkompetenz Gram-positiver Bakterien bzw. deren Oberflächenkomponenten mit Hemmhoftests

Im Hemmhoftest wurde die bakteriolytische Aktivität von Hämolymphe aus *M. sexta*-Larven, die mit verschiedenen Bakterien bzw. bakteriellen Oberflächenkomponenten infiziert wurden, gegen *M. luteus* untersucht.

Alle Hämolympfproben von infizierten Larven wiesen signifikant höhere Lysozymwerte auf als die der Kontrolltiere.

Die getesteten Gram-positiven Bakterien, *B. megaterium*, *M. luteus* bzw. *S. aureus*, sowie Zellwand-Material und Peptidoglukan von *M. luteus* sind im Sinne einer induzierten Erhöhung des Lysozymgehaltes in der Larvenhämolymphe genauso gute Provokatoren wie das Gram-negative Bakterium *E. coli*. Larven, denen Zellwand-Material injiziert worden, wiesen signifikant höhere Werte auf als Larven, denen Peptidoglukan injiziert worden war. Ansonsten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Injektionen der verschiedenen Bakterien die bakteriolytische Aktivität betreffend.

Die Lysozymwerte nach Injektion von *M. luteus* schwankten zum Teil sehr stark (z. B. Abb. 3 Kap. 3.1.1). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass für die *M. luteus*-Injektion nicht selbst angezogene und abgetötete Bakterien verwendet wurden, sondern lyophilisierter *M. luteus*, dessen Handhabung sich als problematisch herausstellte, da er nur schwer zu resuspendieren war. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Lysozymkonzentration in der Hämolymphe infizierter Tiere von der Dosis des Provokators abhängig ist (z. B. DUNN et al. 1987, IKETANI & MORISHIMA 1993). In Hämozyten und Fettkörper von mit Bakterien bzw. löslichem Peptidoglukan induzierten *M. sexta*-Larven wiesen DUNN et al. (1985) einen erhöhten Lysozymgehalt gegenüber nicht-infizierten Larven nach. Besonders bei *in-vitro*-Experimenten war die vom Fettkörper sezernierte Lysozymmenge abhängig von der injizierten Peptidoglukan-konzentration.

Die Injektion von Protoplasten des Gram-positiven *Bacillus subtilis* in *M. sexta*-Larven erhöhte nach DUNN & DAI (1990) signifikant die Lysozymaktivität in der Hämolymphe (24 h p. i.) gegenüber Larven, denen Saline injiziert worden war. Die Lysozymaktivität war demgegenüber nochmals erhöht bei der Injektion intakter *B. subtilis*.

KANOST et al. (1988) injizierten abgetötete Gram-positive (*Bacillus thuringiensis kurstaki*, *M. luteus*, *S. aureus*) und Gram-negative Bakterien (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Salmonella minnesota*) in Larven von *M. sexta* und maßen die Lysozymaktivität in deren Hämolymphe nach 48 h. Sie war bei allen Bakterien-Spezies etwa zehnfach erhöht gegenüber unbehandelten Tieren. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied in der Lysozymaktivität zwischen Larven, die mit *E. coli* D31 bzw. mit *M. luteus* infiziert worden waren, ermitteln. Peptidoglukan und Zellwandmaterial aus *M. luteus* erwies sich als ein genauso wirksamer Provokator wie intakte Bakterienzellen, wobei das lösliche Peptidoglukan höhere Aktivitätswerte lieferte als das Zellwandmaterial.

Unterschiede in den erzielten Lysozymaktivitäten in Abhängigkeit der Peptidoglukan-Aufbereitungen mögen auf die Schwierigkeit zurückzuführen sein, die genauen Dosierungen abzuschätzen.

Sowohl Peptidoglukan-Präparationen als auch Zellwandmaterial lösen eine Immunreaktion bei *M. sexta* aus. Folglich reichen allein spezifische Komponenten der bakteriellen Oberfläche, d. h. im vorliegenden Fall Peptidoglukaneinheiten mit einem relativen Molekulargewicht unter 10 k, zur Auslösung einer Immunantwort aus.

DUNN & DAI (1990) wiesen nach, dass Peptidoglukan bzw. die Grundeinheit aus zwei Kohlenhydratkomponenten mit vier Aminosäuren eine Immunantwort definiert über eine Erhöhung der Lysozymaktivität hervorruft. Sie vermuteten weiterhin, dass das in geringen Mengen konstitutiv in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven vorhandene Lysozym dafür verantwortlich ist, einige Bakterien zu lysieren, so dass Peptidoglukanfragmente frei werden, die wiederum den Fettkörper zur Produktion von mehr Lysozym und weiteren antibakteriellen Proteinen induzieren.

Nach *M. luteus*-Injektionen konnte bei *B. mori* keine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* nachgewiesen werden, während nach Injektion verschiedener Gram-negativer Bakterien und auch von *B. megaterium* erhöhte antibakterielle Aktivitäten bestimmt werden konnten (MORISHIMA et al. 1992). Die Zugabe löslichen Peptidoglukans aus *E. coli* zu Fettkörperkulturen von infizierten und unbehandelten *B. mori*-Larven riefen in beiden Fällen die Synthese und die Sekretion von Lysozym und Cecropin ins Kulturmedium hervor. Dabei war die gemessene Lysozymaktivität abhängig von der Menge des zugegebenen Peptidoglukans. Vergleichsuntersuchungen mit Peptidoglukan von *M. luteus*

belegten, dass jenes von *E. coli* eine deutlich höhere Lysozymaktivität hervorrief. Auch hier wird für Peptidoglykan die Rolle eines Signalmoleküls vermutet (IKETANI & MORISHIMA 1993).

Die Injektion von Peptidoglykan verschiedener Bakterienspezies (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *B. megaterium*, verschiedene *Lactobacillus*-Spezies, *M. luteus*) in *B. mori*-Larven rief nicht in allen Fällen eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* in der Hämolymphe der Larven hervorrief, so z. B. nicht bei Peptidoglykan von bestimmten *Lactobacillus*-Spezies und von *M. luteus* (MORISHIMA et al. 1992). Die Autoren postulierten eine für die Auslösung einer Immunantwort bei *B. mori* minimale Struktur von mindestens vier Kohlenhydratkomponenten und acht Aminosäuren.

Die Auslösung einer Immunantwort bei *B. mori* durch unterschiedliche Peptidoglykanstrukturen wurde dann von IKETANI et al. (1999) anhand der Gram-positiven Bakterien *Bacillus licheniformis*, *Arthrobacter viscosus* und *M. luteus* genauer untersucht. Vergleichend wurden vernetztes (durch Lysozymeinwirkung hergestelltes) Peptidoglykan und nicht-vernetztes lineare Peptidoglykanstrukturen dieser Bakterien injiziert, d. h. durch die Einwirkung von Penicillin auf die wachsenden Bakterienkulturen wurde die Quervernetzung der Peptidseitenketten verhindert. Das lineare Peptidoglykan von *B. licheniformis* und *A. viscosus*, welches auch bei Injektionen der vernetzten Peptidoglykanstrukturen bereits eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität in den *B. mori*-Larven verursachte, rief ähnlich erhöhte Aktivitätswerte hervor. Lineares nicht quervernetztes Peptidoglykan von *M. luteus* – also ohne Pentapeptidbrücke – führte nun jedoch zu deutlich erhöhten antibakteriellen Aktivitäten wie die Fragmente der anderen beiden Bakterienarten auch (IKETANI et al. 1999). Die Vernetzung der Peptidseitenketten spielte offenbar für die Erkennung von Peptidoglykan durch ein potenzielles Erkennungsprotein keine Rolle. Möglicherweise hemmte die Pentapeptidbrücke von *M. luteus* sogar die Erkennung des Peptidoglykans bei *B. mori*.

Auf *M. sexta* treffen die Ergebnisse, die mit *B. mori* gewonnen wurden, nur zum Teil zu. Die Größe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptidoglykan-Fragmente (aus *M. luteus*) wurde zwar nicht exakt bestimmt, zur Herstellung wurde aber kein Penicillin verwendet, so dass davon ausgegangen wird, dass es sich um quervernetztes Peptidoglykan handelte. Es ließ sich kein signifikanter

Unterschied bezüglich der bakteriolytischen Aktivität gegenüber *M. luteus* zwischen den Injektionsexperimenten mit Peptidoglukan-Fragmenten und *M. luteus* bzw. zwischen *M. luteus* und anderen Bakterien wie *E. coli* und *B. megaterium* mit direkter Quervernetzung feststellen. Auch KANOST et al. (1988) führten an, dass bei Injektionen hoher Dosen von *M. luteus* bzw. *E. coli* in *M. sexta*-Larven vergleichbare Lysozymaktivitäten hervorgerufen wurden. Somit lässt sich vermuten, dass es in Bezug auf die Bindungsstellen eines PGRPs für PG bei *B. mori* und *M. sexta* Unterschiede geben muss.

Die minimale Struktur, die notwendig ist, um die Synthese antimikrobieller Proteine bei *B. mori* hervorzurufen, ist eine Einheit, die mindestens aus den zwei Kohlenhydraten N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuramin mit anhängender Peptidseitenkette aus vier Aminosäuren besteht, wobei es unerheblich ist, ob die Peptidkette L-Lysin oder meso-Diaminopimelinsäure enthält (IKETANI et al. 1999). KANOST et al. (1988) beschrieben, dass nicht quervernetzte Peptidoglukanfragmente geschätzten relativen Molekulargewicht von 3.300 genauso wirksame Lysozymaktivitäten hervorriefen wie intakte ganze Bakterien. Mit der Größe des Peptidoglukanpolymers stieg auch die Lysozyminduktion: größere nicht quervernetzten Peptidoglukane führten deshalb zu einer höheren Lysozymaktivität bei *M. sexta* als die mit Lysozym verdauten Zellwände, in denen die Quervernetzung der Peptidseitenketten vorhanden, die Kohlenhydratkette jedoch bedeutend kürzer war.

In Studien bei *D. melanogaster* wurde untersucht, welche spezifische Peptidoglukan-Struktur durch den PGRP-LC-Rezeptor erkannt wird und nachfolgend die Aktivierung des Imd-Signalweges auslöst. Wichtig ist beim Peptidoglukan Gram-negativer Bakterien das Vorhandensein von Diaminopimelinsäure in der Aminosäureseitenkette des N-Acetylmuramins und eine spezielle Anhydridform dieses Kohlenhydrats, so dass sowohl die Peptid- als auch die Kohlenhydratkombinationen des Peptidoglukans für eine optimale Erkennung notwendig sind. Es wurde eine minimale Struktur von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuramin (mit der 1,6-Anhydridbindung!) und vier Aminosäuren, darunter Diaminopimelinsäure, als die für die Erkennung entscheidend eingestuft (STENBAK et al. 2004).

#### 4.1.2 Gelelektrophoretische Analysen und Western Blot zur Überprüfung der Provokatorkompetenz

Mittels gelelektrophoretischer Analysen wurden die Ergebnisse der Hemmhoftests überprüft. Lysozym (MW<sub>r</sub> = ca. 15 k) und Hämolin (MW<sub>r</sub> = ca. 47 k) konnten nach bakterieller Infektion verstärkt in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven nachgewiesen werden.

Die Literaturdaten für das *M. sexta*-Lysozym liegen in diesem Bereich: RUSSELL & DUNN (1990) ermittelten ebenfalls ein relatives Molekulargewicht von 15 k, SPIES et al. (1986) sowie HUGHES et al. (1983) von 17 k. Durch Zugabe von Mercaptoethanol im Probenpuffer kann es zu einer leichten Verschiebung der Lysozym-Bande in der SDS-PAGE kommen (HUGHES et al. 1983). Für Insekten-Lysozyme im Allgemeinen wird ein relatives Molekulargewicht von 14 k bis 16,5 k angegeben (KANOST et al. 1990) geben an.

Mit dem Western Blot unter Verwendung des anti-Lysozym-Antikörpers, der ursprünglich gegen *H. cecropia*-Lysozym gewonnen worden war, konnte die Hypothese bestätigt werden, dass es sich bei den markierten Protein-Banden um Lysozym handelt. Die Lysozyme von *M. sexta* und *H. cecropia* sind sich offenbar sehr ähnlich. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Lysozyme ergab eine Identität von 78,3 % (MULNIX & DUNN 1994).

Hämolin von *H. cecropia* besitzt ein relatives Molekulargewicht von 48 k. (ANDERSSON & STEINER 1987) Es wurde im Fettkörper sowohl von unbehandelten als auch von verwundeten oder infizierten Puppen nachgewiesen. Durch Zugabe von bakteriellen Oberflächenkomponenten zu Fettkörperkulturen wurde die Synthese und Sekretion erhöht (Trenczek & Faye 1988). Bei *M. sexta* wurde Hämolin ebenfalls nachgewiesen (WANG et al. 1995) und eine Bindung an LPS Gram-negativer Bakterien sowie an Lipoteichonsäuren belegt (YU & KANOST 2002). Es kommt nach LADENDORFF & KANOST (1990, 1991) auch in unbehandelten *M. sexta*-Larven vor. Seine Konzentration stieg nach Infektion mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien oder ihren Oberflächenkomponenten wie Peptidoglykan und LPS rapide an. Ein erhöhter Hämolinspiegel in der Hämolymphe konnte erstmals 4 h p. i. nachweisen werden.

Bakterielle Infektionen führten zu erhöhten Lysozym- aber auch Hämolintitern führt. In dieser Arbeit konnte dabei kein Unterschied zwischen den Reaktionen auf verschiedene Bakterien, die zur Injektion verwendet worden waren, festgestellt

werden. MULNIX & DUNN (1994) wiesen mittels *Northern Blot* nach Infektion mit Peptidoglykan eine erhöhte Transkriptionsrate für Lysozym in verschiedenen Geweben von *M. sexta* nach, darunter besonders stark im Fettkörper. Bei *G. mellonella* induzierte sowohl die Injektion von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Bakterien und artifiziellen Substanzen wie Latexpartikel und chinesischer Tusche die Lysozymaktivität in der Hämolymphe erheblich (MOHRIG & MESSNER 1968).

Die erhöhten Lysozym- und Hämolintiter in der Hämolymphe bakteriell infizierter *M. sexta*-Larven können als Zeichen („read-out“) für eine Infektion genutzt werden. Dies allerdings mit Einschränkungen, da die Randbedingungen, beispielsweise der Grundtiter an Lysozym in unbehandelten Larven einer Zuchtserie, bekannt sein müssen. Der Hämolintiter, der normalerweise in unbehandelten Larven kaum messbar ist, steigt mit Vorbereitung auf die Metamorphose in Präpuppen an (YU & KANOST 1999), d. h. Kenntnisse des genauen Alters der Versuchstiere sind für eine korrekte Interpretation unabdingbar.

Im Gegensatz zu Hühnereiweiß-Lysozym konnte für Insekten-Lysozyme von *G. mellonella*, *B. mori* und *Agrius convolvuli* neben einer starken Lyseaktivität gegen Gram-positive Bakterien auch eine gewisse Aktivität gegen Gram-negative Bakterien nachgewiesen werden (YU et al. 2002).

In der vorliegende Studie konnte Attacin in der Hämolymphe mittels eines anti-Attacin-Antikörpers in der Hämolymphe nicht nachgewiesen werden. Dennoch wird vermutet, dass es sich bei den Proteinbanden im relativen Molekulargewichtsbereich von knapp über 20 k um Attacin handelt. Sie sind in den Hämolymphe-Proben infizierter *M. sexta*-Larven stärker ausgeprägt als bei den Kontrolllarven, woraus sich eine Erhöhung der Konzentration dieses Proteins nach bakterieller Provokation schließen lässt. *H. cecropia*-Attacine weisen ein relatives Molekulargewicht von 20 k bis 23 k auf (HULTMARK et al. 1983), Insekten-Attacine allgemein von etwa 20 k (KANOST et al. 1990) und das von *M. sexta* von 20 k bis 22 k (SPIES et al. 1986). Dass, der Nachweis des Attacins im Western Blot mittels des verwendeten Antikörpers, der gegen *H. cecropia*-Attacin gewonnen worden war, nicht gelang, lag wahrscheinlich daran, dass das leicht degradierbare Attacin nicht mehr die für eine Antikörpererkennung notwendigen intakten Epitop-Strukturen aufwies.



*H. cecropia* Attacin-Proteine Beeinträchtigen das Wachstum von *E. coli*-Zellen effektiv. Sie haben jedoch keine Wirkung auf *B. megaterium*, *Enterobacter cloacae* oder tote *E. coli* (HULTMARK et al. 1983).

Bei den Proteinbanden mit einem relativen Molekulargewichtsbereich von unter 14,2 k, könnte es sich um Cecropine handeln. Sie traten nach Infektion der Larven mit Bakterien – insbesondere mit *B. megaterium* und mit *E. coli* – verstärkt auf. Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung dieser Proteine sollte auf einem höherprozentigeren Gel, erfolgen. SPIES et al. (1986) wiesen für *M. sexta* nach bakterieller Infektion Cecropine mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 4 k nach. Nach Induktion mit *E. coli* bzw. *P. aeruginosa* wurden sie bei *M. sexta* verstärkt exprimiert, insbesondere im Fettkörper, aber auch in Hämocyten und weiteren Geweben (Hoffmann et al. 1981, DICKINSON et al. 1988).

Weitere Proteinbanden mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 30 k traten in der Hämolymphe infizierter Larven verstärkt auf. Möglicherweise handelt es sich dabei um Serin-Protease-Homologe. Serin-Proteasen sind an vielen Vorgängen beteiligt, z. B. an den Prozessen, die zur Aktivierung des Toll-Rezeptors oder an der Prophenoloxidasekaskade führen. Eine Serin-Protease, die an der Aktivierung der Prophenoloxidasase beteiligt ist, wurde von JIANG et al. (1998) aus *M. sexta* isoliert. Sie besteht aus zwei Polypeptidketten mit einem relativen Molekulargewicht von 13 k bzw. 31 k, ihre Expression im Fettkörper ist durch bakterielle Infektion mit *E. coli* induzierbar. Yu et al. (2003) reinigten zwei Serin-Protease-Homologe mit relativen Molekulargewichten von 31 k bzw. 36 k aus *M. sexta* auf. Nach bakterieller Induktion mit *E. coli* konnte 2 h bis 48 h p. i. eine verstärkte Expression der Proteine nachgewiesen werden, insbesondere des 31 k-Homologs. Es wurde vermutet, dass dieses Serin-Protease-Homolog als Mediator im Zytoplasma funktioniert. Es könnte an einer Interaktion zwischen Immunolektin-2, das seinerseits an Kohlenhydrate auf Oberflächen von Pathogenen oder Parasiten bindet, der Prophenoloxidasase und anderen Plasmaproteinen wie der Prophenoloxidasase aktivierenden Protease beteiligt sein.

#### **4.1.3 Nachweis von antimikrobiellen Proteinen bzw. Peptiden in den Hämozyten von *M. sexta*-Larven**

Auf Monolayern fixierter Hämozyten von *M. sexta*-Larven (L5d2–3) konnten Attacin, Hämolin und Lysozym nachgewiesen werden. Lysozym und noch deutlicher Hämolin waren bei Hämozyten *M. luteus*- bzw. *E. coli*-infizierter Larven stärker vorhanden als bei den Hämozyten der Kontrolltiere. Dagegen ließ sich bei Hämozyten von mit *M. luteus*-infizierten Larven Attacin nicht stärker nachweisen als bei scheininfizierten Larven.

Zum Nachweis der antimikrobiellen Proteine und Peptide kann Folgendes festgehalten werden: Sowohl Lysozym als auch Hämolin ließen sich in den Granulen der Granulären Zellen nachweisen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit dem von WANG et al. (1995), die Hämolin in den Hämozyten von mit Bakterien infizierten *M. sexta*-Larven (24 h p. i.) ausschließlich in den Granulen der granulären Zellen nachweisen konnten. Sie wiesen den Fettkörper der Larven als den Hauptsyntheseort für Hämolin aus, das aber auch in geringerer Menge in den Hämozyten infizierter Tiere synthetisiert wird. ZHAO & KANOST (1996) gaben zudem an, dass Hämolin an alle Hämozytentypen bei *M. sexta* bindet. Die Verteilung von Attacin war bei den vorliegenden Untersuchungen weniger konzentriert als die von Hämolin oder Lysozym (pünktchenartig) und nicht nur auf einen Zelltyp beschränkt. Jedoch war der Nachweis von Attacin in Plasmtozyten negativ. Immunzytologische Untersuchungen mit Lektinen auf Hämozyten-Monolayern bezüglich eines Unterschieds zwischen bakteriell infizierten und unbehandelten Larven ergaben keinen Unterschied im Bindemuster.

#### **4.2 Phänomene der zellulären Abwehr und ihr zeitlicher Verlauf nach Injektion von Gram-positiven Bakterien in *M. sexta*-Larven**

FITC-markierte *B. megaterium*-Zellen konnten noch 24 h nach der Injektion in den Larven nachgewiesen werden und zwar sowohl assoziiert mit Hämozyten als auch auf dem Fettkörper und der Integumentinnenseite in der Nähe der Injektionsstelle. Dahingegen war *M. luteus* schon nach 1 h nur noch vereinzelt zu finden. Insbesondere auf Hämozyten-Frischzellpräparaten ließen sich FITC-markierte *M. luteus* bis auf eine einzige Ausnahme zu keiner Zeit detektieren. Im Vergleich

zu diesen beiden Gram-positiven Bakterien war das Gram-negative Bakterium *E. coli* noch 5 h p. i. im Hämozyten-Frischzellpräparat nachweisbar.

#### **4.2.1 Verbleib von *B. megaterium* im Hämozöl von *M. sexta*-Larven nach der Injektion**

Der Ablauf der einzelnen Phasen nach bakterieller Infektion lässt sich folgendermaßen rekonstruieren: Zunächst werden im Hämozöl flottierende Bakterien durch Aggregatbildung immobilisiert, woran v. a. Plasmatozyten beteiligt sind. Dem schließen sich Phagozytosevorgänge an. Daran sind sowohl Plasmatozyten als auch Granuläre Zellen und unter Umständen sogar Oenozytoide beteiligt sind. Eine deutliche Abnahme der frei im Hämozöl flottierenden Bakterien geht damit einher. *B. megaterium* ließ sich 24 p. i. sowohl frei im Plasma als auch phagozytiert nachweisen.

Bereits MOHRIG & MESSNER (1968) wiesen auf eine unterschiedlich lange Detektierbarkeit von Gram-positiven Bakterien in der Hämolymphe von *G. mellonella* hin. Während *B. subtilis*-Zellen schon nach 3 bis 5 h in der Hämolymphe lysiert worden waren, konnten *B. megaterium*-Zellen frei und offenbar unverändert „noch sehr lange“ in der Hämolymphe bzw. in Hämozyten detektiert werden.

Frischpräparate des Fettkörpers von mit *B. megaterium* infizierten Larven zeigten ein ähnliches Bild. Zunächst waren die Bakterien über das Fettkörpergewebe verstreut, im weiteren zeitlichen Verlauf wurden sie dagegen lokal konzentriert gefunden. Oft war an diesen Stellen auch eine Melanisierung am Fettkörper zu sehen, und die Bakterien wurden entlang von „Strängen“, die Hämolymphe bzw. den Fettkörper durchzogen gefunden. Ähnliche „Fasern“ (*clotting fibers*) mit denen die FITC-markierte Bakterien assoziiert sind, wurden auch für *G. mellonella* nachgewiesen (THEOPOLD et al. 2004). Sie bilden ein Netzwerk (*clot*) aus, das offenbar dazu dient, Bakterien aus der Hämolymphe wegzufangen.

Nach Injektionen von *E. coli* D31-Zellen und verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme ins Hämozöl von *M. sexta*-Larven wurde die Zahl der lebenden Bakterien bereits innerhalb der ersten Stunde signifikant reduziert (DUNN & DRAKE 1983). Je nach Bakterienstamm und -dosis folgte eine Phase, in der sich die Bakterienkonzentration nicht änderte. Danach kam es entweder wieder zu einer massiven Bakterienvermehrung (bei *P. aeruginosa* P11-1), was den Tod der Larve zur Folge

hatte, oder die Bakterien wurden völlig eliminiert (z. B. bei *E. coli*). Die Eliminierung der Bakterien aus dem Hämözöl wird auf Phagozytose zurückgeführt. GENG & DUNN (1989) konnten bei *M. sexta*-Larven ebenfalls eine Verminderung der frei in der Hämolymphe zirkulierenden Plasmatozyten nach einer Infektion mit Bakterien oder Zellwandmaterial von *M. luteus* feststellen, nicht jedoch nach einer Injektion mit Peptidoglukanfragmenten aus der *M. luteus*-Zellwand.

Über eine direkte Beteiligung von Oeozytoiden am Immungeschehen wie Phagozytose ist bei *M. sexta* nichts bekannt, aber ihre indirekte Beteiligung ist eindeutig. Sie sind die Hauptsyntheseorte der Prophenoloxidase, dem Schlüsselenzym der Prophenoloxidasekaskade, die zu Melanisierung führt (IWAMA & ASHIDA 1986). Wie bereits beschrieben wurde nach der Injektion von Bakterien ins Hämözöl von *M. sexta* meist eine Melanisierung im Bereich um die Injektionsstelle beobachtet. In Vorversuchen zur Ermittlung einer geeigneten Injektionsdosis, kam es bei sehr hohen Bakterienkonzentrationen insbesondere bei Larven des vierten Larvenstadiums sogar zur Melanisierung des gesamten Tieres und in Folge zum Tod. Bei den Präparationen des Fettkörpers bzw. des Integuments um die Injektionsstelle, konnten auf dem Fettkörper auch verschiedene Melanisierungsstellen entdeckt werden, die mit einer geclusterten Ansammlung von Bakterien in Verbindung standen.

Es fiel auf, dass Sphärule Zellen nach Injektionen von *M. luteus* in der Hämolymphe häufiger zu finden waren als bei unbehandelten oder verwundeten Tieren oder nach Injektion anderer Bakterien. HOROHOV & DUNN (1982) stellten bei *M. sexta*-Larven 1 h p. i. mit *P. aeruginosa* ebenfalls eine erhöhte Zahl von Sphärulen Zellen fest. Über eine Funktion der Sphärulen Zellen ist bisher sehr wenig bekannt. Da saure Mucopolysaccharide in ihnen nachgewiesen wurden, wird eine Beteiligung am Aufbau der extrazellulären Matrix angenommen (CROSSLEY 1981, ASHHURST 1982). Inwieweit Sphärule Zellen möglicherweise doch am Immungeschehen beteiligt sind, insbesondere bei Infektionen mit Gram-positiven Bakterien mit Lys-Peptidoglukan wie bei *M. luteus*, ist noch unbekannt.

#### 4.2.2 Verbleib von *M. luteus* im Hämozöl von *M. sexta*-Larven nach der Injektion

Im Gegensatz zu *B. megaterium* und *E. coli* ließ sich *M. luteus* nach Injektion im Hämozöl der *M. sexta*-Larven nicht mehr oder nur kaum sichtbar nachweisen. Aufgrund des nur schwach quervernetzten Peptidoglukans vom Lys-Typ werden *M. luteus*-Zellen offenbar wesentlich schneller lysiert als *B. megaterium* und zwar bereits von den konstitutiv vorhandenen geringen Lysozymmengen in unbehandelten Larven.

Der Lysozymgehalt unbehandelter Larven schwankt sehr stark. Dies kann auf natürliche Infektionen zurückzuführen sein, die während der Zucht der Larven unbemerkt auftraten, aber das Tier nicht weiter beeinflussten. Da die antimikrobiellen Peptide nach dem mechanischen Schutz durch die Kutikula als die „first line defense“ gelten, kann auch die Hämolymphabnahme durch das Abschneiden eines Kranzfüßchens zur sofortigen Lysozymausschüttung führen. Sowohl im Western Blot als auch auf den Hämocytenmonolayern und im Hemmhoftest wurde deutlich, dass schon eine Verwundung, d. h. experimentell eine Injektion von steriler Vollsaline, den Lysozymgehalt der Hämolymphe ansteigen lässt. So wird vermutet, dass das Abschneiden eines Kranzfüßchens, welches eine deutlich größere Verletzung darstellt, eine sofortige Entleerung der Lysozymdepots zur Folge hat.

Bereits MOHRIG & MESSNER (1968) beschrieben individuell stark variierende Werte der Lysozymkonzentration in der Hämolymphe von *G. mellonella*-Larven ( $c_{\text{Lysozym}} = 5\text{--}1.000 \mu\text{g/ml}$  Hämolymphe bei  $n = 324$  Individuen).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass Lysozym eines der ersten antimikrobiellen Peptide ist, das bei einer potenziellen Infektion durch Verwundung eingesetzt wird.

#### 4.2.3 Nachweis der Phagozytose von *B. megaterium* durch Hämozyten von *M. sexta*

Durch verschiedene Quenching-Verfahren wurde versucht, die Fluoreszenz nicht phagozytierter Bakterien zu unterdrücken. Trypanblau in Anlehnung an HED (1986) erwies sich dafür als völlig ungeeignet. Mit Propidiumjodid konnten nur mäßige nicht eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Erst durch transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass *B. megaterium*-Zellen von Hämozyten phagozytiert werden. Es treten gehäuft größere und kleinere Aggregate aus koagulierte Material, Bakterien und Hämozyten auf. Es wird deutlich, dass Bakterien und Granuläre Zellen meist von Plasmatozyten mit ihren Pseudopodien „eingefangen“ und so erste Ansätze einer Aggregation gebildet werden, an die sich weitere Hämozyten anlagern. Einzelne Bakterien wurden auch in freien Granulären Zellen gefunden. Die Hämozyten unterscheiden dabei nicht zwischen vegetativen Zellen oder Sporen bzw. Vorsporen von *B. megaterium*. Sowohl bei den Plasmatozyten als auch bei den Granulären Zellen verläuft die Phagozytose durch ein Umfließen bzw. Umgreifen der Bakterien mittels der Pseudopodien bzw. der Mikrospikes. Ob das koagulierte Material aus den Granulen der Granulären Zellen stammt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es wurden jedoch Granuläre Zellen detektiert, die den Inhalt ihrer Granulen gerade abgeben.

Bei Larven von *G. mellonella* wiesen RATCLIFFE & ROWLEY (1974) ebenfalls elektronenmikroskopisch die Phagozytose von Bakterien (*E. coli*) vornehmlich durch Plasmatozyten, aber auch durch Granuläre Zellen nach. Zunächst ist eine Anlagerung der Bakterien an die Hämozytenoberfläche beschrieben. Die Hämozyten bildeten Pseudopodien bzw. Filopodien aus, deren Spitzen dabei fusionierten, so dass die Bakterien von den Hämozyten vollkommen eingeschlossen wurden. Die Granulären Zellen sonderten darüber hinaus koagulierendes Material ab, in welches die Bakterien eingebettet in die Hämozyten aufgenommen worden waren (ROWLEY & RATCLIFFE 1976a).

In *G. mellonella* konnten schon 5 min nach Injektion von abgetöteten *B. cereus* Aggregate aus vielen Granulären Zellen und auch Plasmatozyten sowie einer großen Anzahl von Bakterien beobachtet werden. Koagulierendes Material war ebenfalls daran beteiligt. Eine solche Aggregatbildung trat auch bei *Pieris brassicae* nach vergleichbaren Versuchen auf (RATCLIFFE & GAGEN 1976).

Bei *M. sexta*-Larven zeigten HOROHOV & DUNN (1983) den Ablauf der Phagozytose und Knötchenbildung nach Injektion von lebenden *P. aeruginosa*: In den ersten 2 h nach einer Injektion kam es zu einer Knötchenbildung aus Hämocyten und Bakterien, wodurch die Zahl der frei zirkulierenden Bakterien um 90 % reduziert wurde. Die meisten Bakterien waren schon innerhalb der ersten 30 min immobilisiert. Es wurden bereits kurz nach der Injektion sehr viele Aggregate aus etwa 10 bis 20 Hämocyten, die eine große Zahl von Filopodien ausbildeten, beobachtet. Größere Hämocytenaggregate aus mehr als 20 Zellen wurden etwa 30 min p. i. erfasst. Die meisten Aggregate waren jedoch 2 h p. i. wieder verschwunden. Es wurden diverse melanisierte Knötchen in Assoziation mit z. B. Tracheen gefunden. Sie bestanden aus so genannter azellulärer Matrix, verklumpten Bakterien und Hämocyten, die z. T. bereits Bakterien phagozytiert hatten. Die restlichen Bakterien wurden offensichtlich in der Zeitspanne von 2 bis 8 h p. i. von den Hämocyten phagozytiert. Eine weitere Knötchenbildung wurde nicht mehr beobachtet.

Bei *Calliphora erythrocephala* waren *in vitro* bereits 5 min nach Injektion die meisten *E. coli*-Zellen an Hämocyten angelagert und nach 15 min nur noch intrazellulär nachweisbar (ROWLEY & RATCLIFFE 1976b).

*B. megaterium* wurde ebenso gut wie *E. coli* von Hämocyten phagozytiert. Nicht phagozytiert wurden hingegen pathogene Stämme von *Photobacterium luminescens* sp. Au et al. (2004) wiesen nach, dass *P. luminescens* dazu in der Lage ist, seine eigene Phagozytose zu hemmen.

Oenocytoide sind bei *M. sexta* vermutlich nicht an der Phagozytose beteiligt. Bei *Cetonia aeruginosa* (Coleoptera) stellte sich jedoch heraus, dass sowohl Granulozyten als auch Oenocytoide zumindest Latexkügelchen phagozytieren können; andere Zelltypen wie Plasmatozyten, Prohämocyten, Koagulozyten oder Sphärule Zellen waren dazu nicht in der Lage (GIULIANINI et al. 2003).

Die Beobachtungen zur Phagozytose von *B. megaterium* in der vorliegenden Arbeit, stimmen mit den Aussagen von ROWLEY & RATCLIFFE (1976b, 1981) überein, dass hauptsächlich die Plasmatozyten phagozytotisch aktiv sind (z. B. bei *Calliphora erythrocephala* mit *E. coli*-Infektion). HOROHOV & DUNN (1983) sowie ANDERL (2001) stellten dies hingegen für die Granulären Zellen bei *M. sexta* mit

*P. aeruginosa*-nfektion bzw. *B. megaterium*- und Tusche-Injektionen fest. Sie differenzierten jedoch insofern, als dass unter den frei zirkulierenden Hämozytentypen die Granulären Zellen am stärksten phagozytotisch aktiv waren und nur wenige Plasmatozyten mit phagozytierten Bakterien beobachtet werden konnten. Bei der Knötchenbildung waren dagegen hauptsächlich Plasmatozyten beteiligt waren. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden in den Aggregaten überwiegend Plasmatozyten detektiert, diese hatten z. T. Granuläre Zellen und Bakterien phagozytiert. Möglicherweise fand zu einem frühen Zeitpunkt (< 5 h) Phagozytose allein durch Granuläre Zellen statt, was in der vorliegenden Untersuchung nicht erfasst wurde.

Zur Auslösung einer Phagozytose oder einer Ausschüttung von koagulierendem Material müssen die Hämozyten ein Signal erhalten. Dieses Signal beruht vermutlich auf der Interaktion zwischen Bakterien einem oder mehreren Vermittlermolekülen bzw. *pattern recognition* Proteinen, d. h. einem Erkennungsprozess.

#### **4.3      Potenzielle Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien aus der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven**

Um potenzielle Bindungsfaktoren für Gram-positive Bakterien aus der Hämolymphe mittels Affinitätspräzipitation im Batch-Verfahren zu isolieren, wurde anfangs *M. luteus* als Affinitätsmatrix eingesetzt. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, dass die Matrix nach Inkubation mit Hämolymphe von *M. sexta*-Larven lysiert wurde und so für den Versuch nicht einsetzbar war.

Deshalb wurde die Lyse von *M. luteus* durch die Hämolymphe von *M. sexta* genauer untersucht. Es wurde davon ausgegangen, dass das in der Hämolymphe konstitutiv enthaltene Lysozym für die Lyse von *M. luteus* verantwortlich ist. Bei *in-vitro*-Versuchen mit vergleichbaren Lysozymkonzentrationen stellte sich heraus, dass dies innerhalb kürzester Zeit (5 min) geschieht, wobei der stärkste Abbau vermutlich innerhalb der ersten Minute statt findet.

Obwohl Lysozym gemeinhin als bakteriolytisches Enzym gegen Gram-positive Bakterien gilt, ist es dennoch dazu in der Lage auch Gram-negative Bakterien zu lysieren, insbesondere bei Zugabe komplexbildender Agenzien wie EDTA. So wird



*M. luteus* bereits durch 1 µg Lysozym/ml aufgelöst. Für die Lyse von *B. megaterium* sind immerhin 50 µg Lysozym/ml notwendig (SCHLEGEL 1992). Auch mit Formalin abgetöteter *E. coli* D31 erwies sich als sensitiv gegenüber *M. sexta*-Lysozym, wenn auch die Lyse bedeutend langsamer und weniger stark im Vergleich zu *M. luteus* war (DUNN & DAI 1990).

Daraufhin wurden zwei verschiedene in der Literatur beschriebene Hemmstoffe, Imidazol und Histamin, untersucht und geeignete Konzentrationen zur Hemmung der Lyse ermittelt. Es stellte sich heraus, dass einerseits die in den Hemmversuchen ermittelte Histaminkonzentration von 0,8 M nicht ausreichend war, um die Lyse von *M. luteus* bei Affinitätspräzipitation ausreichend zu hemmen – Verunreinigungen durch lysierten *M. luteus* in den erhaltenen Präparaten waren weiterhin vorhanden – andererseits führte die Zugabe von Histamin zum Versuchsansatz schon in dieser Konzentration zum Ausfallen kristalliner Substanzen, die dadurch den weiteren Versuchsablauf behinderten. Imidazol musste bereits in den *in-vitro*-Versuchen in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um eine dem Histamin vergleichbare Hemmung zu erreichen, und wurde deshalb auch nicht für weitere Versuche eingesetzt. Aus diesem Grund wurde von einer Affinitätspräzipitation mit *M. luteus* als Matrix Abstand genommen.

Da sich *B. megaterium* als ebenso guter Provokator erwiesen hatte und weniger sensitiv gegenüber Lysozym ist, wurde dieses Gram-positive Bakterium als Affinitätsmatrix eingesetzt.

Bei der Affinitätspräzipitation mit *B. megaterium* als Matrix wurde diese vom in der Hämolymphe vorhandenen Lysozym ebenfalls teilweise lysiert. Dies führte wie beim Einsatz der *M. luteus*-Matrix zu bakteriellen Verunreinigungen in den folgenden Präparationsschritten, wenn auch in geringerem Ausmaß. Dennoch konnte in der gelelektrophoretischen Analyse ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 15 bis 20 k ausgemacht werden, das nur in der entscheidenden Desorptionsprobe bzw. in „Waschproben“ zuvor vorhanden war. Es wird daher angenommen, dass es sich möglicherweise um einen in der Hämolymphe vorhandenen Bindungsfaktor für *B. megaterium* handelt, der allerdings nicht erst im entscheidenden Desorptionsschritt von den Bakterien abgelöst wurde, sondern vermutlich teilweise in vorherigen Waschschritten. Versuchswiederholungen sollten deshalb auch bei *B. megaterium* mit

Hemmstoffen in niedriger Konzentration durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten vergleichende Studien mit Hämolymphe von unbehandelten und mit verschiedenen Bakterien infizierten Larven durchgeführt werden, wobei der höhere Lysozymgehalt zu beachten wäre.

Mit ähnlichen Versuchsaufbauten wurden bereits Gram-negative Bakterien- und LPS-bindende Proteine aus der Hämolymphe von *B. mori* isoliert (LEE et al. 1996, KOIZUMI et al. 1997) sowie ein PGRP mit einem relativen Molekulargewicht von 19 k (YOSHIDA et al. 1996). Letzteres wurde von OCHIAI & ASHIDA (1999) auch aus einer cDNA-Fettkörperbank von *B. mori* isoliert.

Während der Arbeiten zu diesem Projekt wurden im Rahmen eines EST-Projekts die Sequenzen zweier *peptidoglycan recognition proteins* in einer cDNA-Fettkörperbank von *M. sexta*-Larven gefunden (YU et al. 2002, ZHU et al. 2003a). Das *M. sexta*-PGRP wies eine 54%ige Identität mit *B. mori*-PGRP und eine 61%ige mit dem von *T. ni* auf sowie eine 24%ige Identität mit dem Lysozym der Bakteriophagen T3 und T7. Es besitzt ein relatives Molekulargewicht von 19 k. Seine mRNA wurde in geringer Konzentration im Fettkörper naiver Larven nachgewiesen; nach bakterieller Induktion stieg sie deutlich an. Auch im Zytoplasma wurde PGRP 24 h und 32 h p.i. mit *M. luteus* in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Ob es unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu einzelnen Gram-positiven Bakterienarten aufweist, ist bislang nicht bekannt.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit mittels Affinitätspräzipitation bestimmten potenziellen Bindungsfaktor aus der Hämolymphe von *M. sexta*, der ein relatives Molekulargewicht von 15 k bis 20 k aufweist, könnte es sich um dieses PGRP handeln.

Inzwischen sind zahlreiche Proteine und Peptide, die in das Immungeschehen involviert sind, aus der Hämolymphe von *M. sexta* isoliert worden: Neben dem bereits genannten PGRP zählen dazu die (1) *pattern recognition* Proteine Hämolin, vier Immunolektine, zwei  $\beta$ -1,2-Glukan-Erkennungsproteine, (2) die antimikrobiellen Proteine und Peptide Lysozym, Cecropin, Attacin, Leocin, Moricin und Gloverin, (3) Serin Proteasen wie drei Prophenoloxidase-aktivierende Proteasen, vier Hämolymphe Proteasen, Scolexin und zwei Serin Protease Homologe, (4) drei Protease Inhibitoren (Serpine), (5) weitere Enzyme wie zwei Prophenoloxidasen und Carboxylesterasen, und (6) außerdem noch Hämocyten-modulierende Proteine

zu denen neben Hämolin auch das *hemocyte aggregation-inhibiting* Protein und das *plasmotocyte-spreading* Protein (zusammengestellt von Kanost et al. 2004, SCHOLZ 2002, YU et al. 2002)

#### 4.4 Ausblick: PGRPs bei *M. sexta*

Nachdem das Vorhandensein von PGRPs mit zwei etwas unterschiedlichen Sequenzen bei *M. sexta* durch die Arbeitsgruppe um M. KANOST (Manhattan, KS, USA) nachgewiesen wurde, müssen nun weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des PGRPs unternommen werden, die folgende mögliche Fragen beantworten:

Gibt es bei *M. sexta* nur ein bzw. zwei PGRPs oder eine ganze PGRP-Familie wie bei *D. melanogaster* (Werner et al. 2000)? Falls es mehrere PGRPs gibt, sind dies alles lösliche, sezernierbare Moleküle wie das von YU et al. (2002) beschriebene oder kommen auch membrangebundene PGRPs vor? Es wurden zwei „full length“-Klone von ZHU et al. (2003a) isoliert, die neben unwesentlichen Unterschieden in der 3'-UTR (*untranslated region*), offenbar besonders in der N-terminalen Region differieren. So weist nur einer der Klone die Sequenz für ein Signalpeptid auf. Über potenzielle membranbindende Domänen in der Sequenz des zweiten Klons wurde keine Aussage getroffen.

Weist das *M. sexta*-PGRP eine typische PGRP-Domäne auf wie die PGRPs von *Drosophila* und *B. mori* (WERNER et al. 2003)?

Welche Bindungsspezifität besitzt das *M. sexta*-PGRP? Welches genaue Strukturfragment des Peptidoglukans bindet das *M. sexta*-PGRP?

PGRP-LC von *D. melanogaster* ist in die Bindung Gram-negativer Bakterien involviert (GOTTAR et al. 2002, RÄMET et al. 2002). Trifft dies auch auf die *M. sexta*-PGRPs zu?

Es wurde nachgewiesen, dass das *M. sexta*-PGRP keine Lysozymaktivität besitzt (YU et al. 2002). Ist möglicherweise eine Amidaseaktivität (MELLROTH et al. 2003) vorhanden?

#### **4.5 Screening der Hämozyten- und der Fettkörper-cDNA-Bank von *M. sexta* mit monoklonalen Antikörpern – Methodenkritik**

Ziel des Screenings der beiden cDNA-Expressionsbanken war es, mögliche Klone, die Sequenzen für am Abwehrgeschehen beteiligte Proteine enthielten, zu isolieren. Darüber hinaus sollten Hinweise über die Identität und die Funktion von Proteinen erhalten werden, die als Antigen für die verwendeten Antikörper dienen, unter Umständen sogar artübergreifend bei Verwendung von *D. melanogaster*-Antikörpern.

Mit den verwendeten Methoden konnte ein Antigen, Annexin IX bzw. B9, detektiert werden, das für *M. sexta* bisher noch unbekannt war und über dessen Funktion bei auch bei *B. mori* bzw. *D. melanogaster* bislang nur spekuliert wird.

Beide cDNA-Banken wurden mit monoklonalen Antikörper gegen *M. sexta*- und gegen *D. melanogaster*-Hämozyten gescreent. Nur mit einem Antikörper, MS#78, konnten positive Ergebnisse erzielt werden. Mit mAk MS#78 wurden 48.000 *plaque forming units* der Hämozyten-Bank und 60.000 *plaques forming units* der Fettkörperbank gescreent bis erste positive Ergebnisse vorlagen. Da mit vielen anderen monoklonalen Antikörpern gegen *M. sexta* bzw. *D. melanogaster* bis dato weit aus weniger *plaque forming units* gescreent worden sind, bedeutet das bisherige Ausbleiben von positiven Ergebnissen nicht, dass in den cDNA-Banken keine Sequenzen für die zu den Antikörpern passenden Antigene enthalten sind.

Ein Screening mit einer Mischung aus verschiedenen Antikörpern bietet dabei verschiedene Vor- und Nachteile. Der Vorteil liegt darin, dass mit einem Ansatz, mehrere Antikörper getestet werden können. Allerdings muss bei positivem Ergebnis im Erstscreening noch ein zusätzliches Screening erfolgen, um herauszufinden, welcher der Antikörper des Gemisches das positive Ergebnis lieferte. Von Nachteil ist, dass die Konzentration der einzelnen Antikörper im Gemisch geringer ist und schwache Signale dann möglicherweise nicht erkannt werden können. Darüber hinaus kann die Bindung eines Antikörpers an das Antigen unter Umständen die Bindung des anderen verhindern, wenn Teile des Epitops für die Antikörperbindung am Antigen bei beiden Antikörpern überlappen. Es wird deshalb empfohlen, bei der Verwendung von Antikörpergemischen im

Screening bei nicht eindeutigen Ergebnissen, die Antikörper nochmals einzeln zu testen.

#### **4.6 Identifizierung und Charakterisierung des *M. sexta* Annexin IX**

Die durch das Screening von Hämozyten- und Fettkörperbank von *M. sexta* mit mAk MS#78 detektierten und isolierten Klone enthielten alle (Teil-)Sequenzen für ein als Annexin IX bzw. B9 identifiziertes Antigen von *M. sexta*.

##### **4.6.1 Beurteilung der sequenzierten MS#78-positiven Klone**

Aus dem Sequenzvergleich aller sechs Klone wurde deutlich, dass es verschiedene Sequenzbereiche mit hoher Übereinstimmung gibt und Bereiche, die wenig Gemeinsamkeiten aufweisen, sowie solche Bereiche, die nicht in jeder Sequenz vorhanden sind. Werden zunächst nur die voll durchsequenzierten Klone MH5/1-1i1, MH6/1-8i1 und MF7/3-1i2 berücksichtigt und mit den cDNA-Sequenzen der drei *B. mori*-Annexin IX-Isoformen verglichen, so wird bei den *M. sexta*-Klonen sehr schnell ein Sequenz-„Muster“ deutlich, das in exakt gleicher Form auch bei *B. mori* vorkommt (Xia et al. 2001): Alle drei *M. sexta*-Sequenzen besitzen das gleiche 3'-Ende und ein deutlich längeres gleiches 5'-Ende. Das 5'-Ende bei Klon MH6/1-8i1 ist um etwa 217 nt (plus eine potenzielle 5'UTR) verkürzt, was auf ein Präparationsartefakt bei der Herstellung der cDNA-Bank zurückgeführt werden kann (z. B. Degradation der mRNA bzw. der cDNA vor dem Einklonieren). Zwischen diesen beiden Abschnitten liegen Sequenzabschnitte, die entweder nur bei einem oder bei jeweils zwei der drei Klone vorkommen.

Kleinere Abweichungen bezüglich der Länge des Poly(A)-Schwanzes können ebenfalls auf Präparationsartefakte bei der Herstellung der cDNA-Banken zurückzuführen sein. Abweichungen einzelner Basen, die sich allerdings niemals bei der Translation in die Aminosäuresequenzen auswirken oder gar im nicht mehr translatierten Sequenzbereich liegen, können auf unterschiedliche Allele einzelner *M. sexta*-Individuen zurückzuführen sein, da die cDNA-Banken jeweils aus mehreren Individuen gewonnen wurden (Scholz 2002).

Im Vergleich mit den cDNA-Sequenzen der drei Annexin IX-Isoformen von *B. mori* fällt auf, dass bei den Isoform-spezifischen Sequenzen (rot, gelb, blau) im Bereich nach dem Stoppcodon eine größere Variabilität zwischen *M. sexta* und *B. mori* auftritt als im translatierten Bereich. Die *B. mori*-Sequenzen weisen außerdem in vielen Bereichen mehr Nukleotide auf als *M. sexta*. Es sind jedoch hier trotzdem viele Abschnitte mit Übereinstimmungen zu finden.

Der einzige Sequenzabschnitt in Klon MH6/1-8i1, der sich in keiner der anderen beiden Klone oder bei den *B. mori*-cDNA-Sequenzen in vergleichbarer Weise wiederfinden lässt und vermutlich ein noch nicht gespleißtes Intron darstellt, wird in Kapitel 4.4.3.2 diskutiert.

Werden die drei ansequenzierten Klone MF7/1-2i3, MF7/2-5i1 und MF8/1-1i2 betrachtet, so fällt auf, dass das 5'- und das 3'-Ende von Klon MF7/2-5i1 in einem weiten Bereich überlappen. Es ergibt sich hier eine vollständige Sequenz wie bei Klon MH5/1-1i1, die nur in einzelnen Basen von dieser abweicht (unterschiedliche Allele, siehe oben). Diese Variabilitäten wirken sich nach Translation auf Ebene der Aminosäuresequenz nicht aus. Das Sequenzierungsergebnis der Klone MF7/1-2i3 und MF8/1-1i2 ist nicht aussagekräftig, so dass eine Wiederholung dringend empfohlen wird. Aus dem *Alignment* lässt sich dennoch zumindest erkennen, dass die Sequenz von Klon MF7/1-2i3 ein 5'-UTR aufweist, wenn auch um 19 nt kleiner als die Sequenz der Klone MH5/1-1i1 und MF7/3-1i2. Die Sequenzierung vom 3'-Ende her weist besonders viele nicht genau bestimmbare Nukleotide (N) auf, so dass das *Alignment* hier keinen Informationsgewinn liefern kann, jedoch wird aufgrund der Länge der Sequenz vermutet, dass es sich hier um eine ähnliche Sequenz handelt wie die von Klon MH6/1-8i1. Eine vollständige Sequenzierung würde hier Gewissheit bringen, auch darüber, ob es sich bei diesem Klon unter Umständen um die vollständige Sequenz der potenziellen Isoform A handelt.

Bei Klon MF8/1-1i2 wird aufgrund des *Alignments* vermutet, dass es sich um die potenzielle Isoform B handelt. Die Hypothese kann auch hier nur eine vollständige Sequenzierung verifizieren. Es kann jedoch bereits festgestellt werden, dass dieser Klon keine vollständige kodierende Sequenz enthält. Es fehlen 5' etwa 318 nt (plus eine potenzielle 5'-UTR).

Die Bestimmung der Länge der cDNA mittels Agarosegel-Elektrophorese kann nur eine grobe Abschätzung sein. So stimmten zwar die über das Gel ermittelten Längen der Klone MH6/1-8i1 und MF7/2-5i1 in etwa mit der tatsächlichen Basenzahl überein. Bei Klon MH5/1-1i1 war diese Abschätzung jedoch etwa um die Hälfte kleiner und auch bei Klon MF7/3-1i2 lag sie deutlich niedriger. Die in dargestellten Werte (Tab. 7) können deshalb nur als Orientierung für die Sequenzierung dienen.

#### **4.6.2 Identifizierung potenziellen *M. sexta*-Annexin IX-Isoformen**

Es wurde bereits erläutert, dass große Ähnlichkeiten zwischen den cDNA-Sequenzen von *M. sexta* und den Sequenzen der *B. mori*-Annexin IX-Isoformen bestehen, insbesondere bezüglich der „Musterbildung“ bei der Sequenzanordnung. Deshalb werden Übereinstimmungen bzgl. der potenziellen Aminosäuresequenzen im Vergleich mit den Sequenzen von *B. mori* diskutiert.

##### **4.6.2.1 Kurze Darstellung des *B. mori*-Annexin IX**

Bei *B. mori* liegt das Annexin IX-Protein in drei Isoformen vor (XIA et al. 2001). Diese entstehen durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts eines Gens. Die Länge der Aminosäuresequenz der drei Isoformen unterscheidet sich nur minimal: Isoform A ist 324 aa, die Isoformen B und C 323 aa lang. Die ersten 307 aa aller drei Isoformen sind jeweils identisch und sie differieren nur in ihrem C-terminalen Enden.

Die Länge der entsprechenden Nukleotidsequenzen unterscheidet sich jedoch erheblich zwischen den Isoformen. Allen drei gemeinsam ist eine 921 nt lange Teilsequenz mit einer davorliegenden 69 nt langen 5'-UTR. Nach der allen Isoformen gemeinsamen Teilsequenz folgen die spezifischen Teilsequenzen A, B und C, wobei zunächst die Isoform A-spezifische Teilsequenz folgt. Direkt an diese an schließt sich die Isoform B-spezifische Teilsequenz und daran wiederum die Isoform C-spezifische Sequenz mit dem Poly(A)-Schwanz. Das heißt, die Nukleotidsequenz der mRNA von Isoform A enthält auch die Sequenzen, die für die anderen beiden Isoformen kodieren. Das erste für die Translation relevante Stoppcodon nach den 921 nt der allen Isoformen gemeinsamen N-terminalen Sequenz erfolgt schon nach 51 nt im A-spezifischen Sequenzabschnitt. Alle

folgenden Nukleotide, auch diejenigen, die für Isoform B und C kodieren, sind nicht mehr für eine Übersetzung in die Aminosäuresequenz relevant. Wird die Isoform A-spezifische Sequenz herausgeschnitten, so dass auf die gemeinsame N-terminal Sequenz die Isoform B-spezifische Nukleotidsequenz folgt, findet sich 48 nt nach der gemeinsamen Sequenz das erste Stoppcodon, so dass auch hier der noch anhängende Isoform C-spezifische Sequenzteil nicht mehr translatiert wird. Für Isoform C werden sowohl die Isoform A- als auch der Isoform B-spezifische Teilsequenz aus dem Gen gespleißt. Damit wird nach den ersten gemeinsamen 921 nt direkt die Isoform C-spezifische Sequenz angeschlossen und das Stoppcodon folgt nach 48 nt. Aus einem Gen können so drei verschiedene Isoformen entstehen.

#### **4.6.2.2 Vergleich des *B. mori*-Annexin IX mit dem von *M. sexta***

Die Datenbank-Recherchen der Nukleotidsequenzen der Klone MH5/1-1i1 (bzw. MF7/2-5i1), MH6/1-8i1 und MF7/3-1i2 zeigten bereits hohe Übereinstimmungen mit den Sequenzen der verschiedenen Isoformen des *B. mori*-Annexin IX. Es ergaben sich kleine Differenzen bezüglich der Isoformen-Ähnlichkeit, die sich aber auf Aminosäureebene nicht auswirkten. Die Ergebnisse des Aminosäuresequenz-Vergleichs werden durch die *Alignments* bestätigt. Betrachtet man den den Isoformen gemeinsamen Sequenzbereich bei beiden Spezies, erkennt man, dass der Unterschied zwischen *M. sexta* und *B. mori* auf 17 von 307 aa beruht. Sechs Aminosäure-Austausche sind konservativ, d. h. die unterschiedlichen Aminosäuren gehören zu einer Aminosäuregruppe.

Beim Vergleich der variablen C-terminalen Sequenz der Annexin-Isoformen von *B. mori* (Isoform A 17 aa, Isoform B und C 16 aa) und *M. sexta* (alle Isoformen 16 aa) fällt auf, dass an drei Positionen die Aminosäuren bei allen Isoformen völlig übereinstimmen. Bei einem Einzelvergleich der Sequenzen zeigte sich, dass sich die Isoformen A nur in der letzten Aminosäure voneinander unterscheiden. Dabei handelt es sich außerdem um einen konservativen Aminosäureaustausch. Die Teilsequenzen der Isoformen B unterscheiden sich in den ersten zwei Aminosäuren sowie den Aminosäuren der vierten und neunten Position. Auch hier handelt es sich immer um konservative Aminosäureaustausche. Die größte Variabilität liegt bei den Isoformen C vor. Sie unterscheiden sich in der 16 aa langen Teilsequenz in vier Aminosäuren. Zwei dieser Austausche sind allerdings



nicht konservativ (9. Position: *B. mori* Histidin – *M. sexta* Asparagin; vorletzte Position: *B. mori* Serin – *M. sexta* Cystein). Der Unterschied zwischen den spezifischen Isoformen bei *B. mori* und *M. sexta* ist kleiner als zwischen den Isoformen innerhalb einer der Insektenpezies.

Aufgrund dieser sehr hohen Übereinstimmungen bei den Sequenzen der *M. sexta*-Klone und mit Annexin IX von *B. mori* sowie den Ähnlichkeiten bei der Anordnung der Teilsequenzen wird angenommen, dass ein Annexin IX bzw. B9 für *M. sexta* mit drei Isoformen entdeckt wurde. Wenn auch für Isoform A keine vollständige Sequenz (unvollständiger N-terminaler Bereich) vorliegt, so kann doch davon ausgegangen werden, dass wegen der kaum abweichenden restlichen Nukleotidsequenzen im Vergleich mit den Sequenzen der anderen *M. sexta*-Klone, ein diesen Sequenzen entsprechender N-terminaler Bereich für Annexin A vorliegt. Damit dürfte die in Abbildung 38 dargestellte Sequenz von Isoform A zutreffen.

Zusätzlich liegen große Übereinstimmungen zwischen der Aminosäuresequenz des *M. sexta*-Annexin IX und des Annexin IX (B9) von *D. melanogaster* (Accession no. P22464 Genbank) auf Aminosäureebene vor.

Nach der 1999 auf der „50th Harden Conference on Annexins“ vorgeschlagenen Nomenklatur ([http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/gene\\_family.shtml](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/gene_family.shtml)), können die drei Annexin-Isoformen von *M. sexta* auch als Annexin B9a, -B9b bzw. -B9c bezeichnet werden, wenngleich sich diese Nomenklatur für Invertebraten-Annexin offenbar noch nicht durchgesetzt hat.

#### **4.6.3 Charakterisierung des *M. sexta*-Annexin IX**

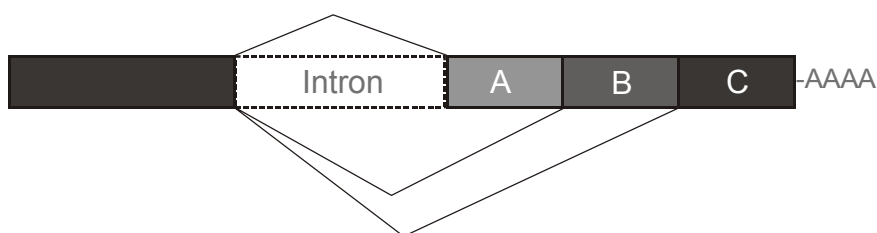
Da bei Annexinen das alternative Spleißen zur Herstellung verschiedener Genprodukte ein bekannter Prozess ist und bei *M. sexta* aufgrund der Sequenzanalysen ein identischer Mechanismus wie bei *B. mori* angenommen wurde, soll zunächst genauer auf diesen Prozess eingegangen werden.

Im Anschluss daran werden verschiedene mögliche Eigenschaften und Charakteristika des *M. sexta*-Annexin IX erörtert.

#### 4.6.3.1 Entstehung von drei Isoformen des *M. sexta*-Annexin durch alternatives Spleißen

Die hohe Übereinstimmung sowohl in der Aminosäure- als auch in der Nukleotidsequenz zwischen dem Annexin IX-Protein von *M. sexta* und dem von *B. mori* lässt einen dem dort ähnlichen, wenn nicht sogar identischen Prozess des alternativen Spleißens vermuten. Bei Betrachtung der Spleißstellen der cDNA-Sequenzen von *B. mori* (XIA et al. 2001) und der von *M. sexta* kann festgehalten werden, dass sowohl die letzten drei Nukleotide (GCT-3') der den jeweiligen Isoformen gemeinsamen Sequenzen vollkommen übereinstimmen. Das gleiche gilt auch für das 5'-Ende der Isoform A- und B-spezifischen Sequenzen (sie beginnen mit 5'-GA) und das 3'-Ende der jeweiligen Isoform A- und Isoform B-spezifischen Teilsequenzen (CAG-3' bei *B. mori* und bei *M. sexta*). Nach MOUNT (1982) sollte der das nachfolgende Exon betreffende Teil der Akzeptorsequenz immer mit 5'-G beginnen, während der das vorangegangene Exon betreffende Teil der Donorsequenz mit  $C_{/A}AG-3'$  endet. Die Isoform-spezifischen Teilsequenzen stimmen mit diesen Konsensussequenzen überein. Das 3'-Ende der gemeinsamen Teilsequenz bildet dabei jedoch eine Ausnahme.

Ein Mechanismus wie der Vorliegende wird von BLACK (2003) Spleißen mit alternativen 3'-Spleißstelle genannt, d. h. dass mit dem Intron ein oder mehrere direkt nachfolgende Exons herausgeschnitten werden können und so das nächste Exon verschieden lang sein kann (Abb. 51).



**Abb. 51:** Spleißen mit alternativer 3'-Spleißstellen. Konstitutive Teilsequenzen, die in allen reifen mRNAs vorhanden sind, sind dunkelgrau, Teilsequenzen, die nicht immer vorhanden sind, sind in helleren Grautönen dargestellt, der PolyA-Schwanz ist angedeutet (verändert nach BLACK 2003).

Die Ergebnisse, die für von *M. sexta* gewonnen wurden, d. h. die Nukleotid- und die Aminosäuresequenzen und die überwiegenden Übereinstimmungen mit den Konsensussequenzen an den Spleißstellen, sprechen für dasselbe Spleißmuster wie beim *B. mori*-Annexin IX-Gen, auch wenn für *M. sexta* das Annexin IX-Gen

noch nicht nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass ein Stück der genomischen DNA amplifiziert werden konnte, das zumindest die Länge der DNA betreffend mit der cDNA in diesem Bereich übereinstimmt, belegt zumindest, dass dort keine Introns vorhanden sind und keine weitere Gensequenz. Eine sehr ähnliche Struktur der genomischen DNA wie beim *B. mori*-Annexin IX-Gen wird daher angenommen.

Im Vergleich mit anderen Annexin-Sequenzen als denen von *D. melanogaster* oder von *B. mori* wie denen der A-Familie (Vertebraten) fällt auf, dass Variabilität am C-terminalen Ende der Annexin-Sequenz deutlich weniger häufig vorkommt als im N-terminalen Bereich. So ist gerade die unterschiedliche N-terminale Region bei den humanen Annexinen (Annexin A1 bis Annexin A13 bei MOSS & MORGAN 2004) ein Unterscheidungsmerkmal der einzelnen Annexine und wird mit ihrer spezifischen Funktion in Verbindung gebracht. Bei *B. mori* existieren neben dem bereits erwähnten Annexin IX (XIA et al. 2001) noch zwei weitere Sequenzen (EN16 und EN16b [Accession nos. AB041636 und AB041637 (Genbank)], TSUZUKI et al. 2001). Sie unterscheiden sich nur geringfügig voneinander: In beiden cDNA-Sequenzen sind 10 bzw. 11 Nukleotide in der nicht-kodierenden Region nach dem Translationsstoppcodon eingefügt, die in der jeweils anderen Sequenz fehlen. Nach der Translation unterscheiden sich diese Aminosäuresequenzen nur an zwei Stellen von Annexin IX-B (XIA et al. 2001). Eine davon konnte nicht translatiert werden, da ein Nukleotid in zweiter Position eines Codontripletts nicht sicher determiniert (N) war. Außerdem ist Annexin B13 mit zwei Sequenzen (Annexin B13a und B13b [Accession nos. AB063189 und AB063190 (Genbank)], MATSUNAGA & FUJIWARA 2002) nachgewiesen. Hier variiert allerdings die N-terminale Region: Nach sechs identischen Aminosäuren bei beiden Isoformen folgt nur bei Isoform B13a eine 165 aa lange Teilsequenz, bevor die restlichen 315 aa wieder bei beiden Isoformen vorhanden sind. Annexin B13 weist gewisse Übereinstimmungen mit Annexin IX auf, weicht jedoch auch in vielen Bereichen davon ab. Besonders die 165 aa Teilsequenz von Annexin B13a im N-terminalen Bereich kommt bei keiner anderen Isoform vor. Die Aminosäuresequenz von Annexin B13a ist 486 aa lang, die von Annexin B13b besitzt 321 aa. Zwar ist die Möglichkeit, dass es sich bei den beiden Sequenzen um Isoformen handeln könnte, von MATSUNAGA & FUJIWARA (2002) nicht diskutiert worden, jedoch sollte

sie nicht ausgeschlossen werden. So könnte auch hier der Mechanismus des alternativen Spleißens vorliegen, auch wenn die Sequenzen an den potenziellen 5'- und 3'-Spleißstellen stark von den Konsensussequenzen abweichen. MOSS & MORGAN (2004) gaben ebenfalls an, dass es sich bei der eben genannten Teilsequenz um ein alternativ gespleißtes Exon handelt ohne darauf weiter einzugehen.

Von *D. melanogaster* sind bisher drei Annexine bekannt: Annexin B9 mit zwei Isoformen, B9a und B9b (*Accession nos.* AY007377 bzw. AF261718 [Genbank], STOLTZFUSS & GROTEWIEL 2000, *direct Submission*) bzw. Annexin IX (*Accession no.* z. B. NM\_206531 [Genbank] u. a., *Drosophila*-Genom-Projekt), Annexin X (*Accession no.* X78323 [Genbank], JOHNSTON et al. 1990) und Annexin B11 (*Accession no.* AJ276963 [Genbank], FERNANDEZ bzw. FERNANDEZ & MORGAN 2000, *direct Submission*). Nach MOSS & MORGAN (2004) liegt auch bei Annexin B9 von *D. melanogaster* im C-terminalen Bereich alternatives Exon-Spleißen vor.

Bei den Annexinen der A-Familie tritt ein solcher Mechanismus im N-terminalen Bereich auf. So existieren beispielsweise vom bovinen Annexin XI zwei Isoformen, die sich im aminoterminalen Bereich der Nukleotidsequenz unterscheiden. Durch alternatives Exon-Spleißen des Primärtranskripts wird dort jeweils nur eines von zwei Exons verwendet, was zu unterschiedlichen Isoformen auch in der Länge der Aminosäuresequenz führt (TOWLE et al. 1992). Beide Isoformen reagieren unterschiedlich: Nur Annexin XI-A bewirkt die Bildung von kugelförmigen Annexin XI-assoziierten Vesikeln unter den gegebenen Versuchsbedingungen (SUDO et al. 1996) und nur diese Isoform ist fähig Calcyclin, ein Mitglied der S100-Proteinfamilie, zu binden (SUDO & HIDAKA 1998).

#### 4.6.3.2 Untersuchung des potenziellen Introns in Klon MH6/1-8i1

Wird das potenzielle Intron in der Sequenz von Klon MH6/1-8i1 (magentafarben markiert in Abb. 33) bezüglich der Konsensussequenzen betrachtet, so fällt zunächst auf, dass an gleicher Stelle bei *B. mori* ein Intron im Gen vorliegt (Abb. A7 im Anhang), das gewisse Sequenzübereinstimmungen mit dem von *M. sexta* aufweist, insbesondere im 5'- und 3'-terminalen Bereich des Introns. Die 5'-Spleißstelle des Introns weist bei der Donorsequenz nach MOUNT (1982) auf der Exonseite die schon in Kapitel 4.4.3.1 erwähnte Eigentümlichkeit auf, stimmt aber auf der Intronseite voll mit der Konsensussequenz (Exon <sup>C</sup>/<sub>A</sub>AG | GT<sup>A</sup>/<sub>G</sub>AGT

Intron) überein. Die Akzeptorsequenz der 3'-Spleißstelle stimmt mit der minimalen Konsensussequenz (Intron <sup>C</sup>/T<sub>AG</sub> | G Exon) auf beiden Seiten exakt überein. Auch bei beispielsweise Annexin 2 von *Rattus* und *Mus* stimmen die Sequenzen die 5'- und 3'-Spleißstellen des Introns zwischen Exon 3 und 4 betreffend völlig mit den Konsensussequenzen überein (OZEKI et al. 2002). Gleiches trifft für Introns des humanen Annexin A13 zu, von dem man annimmt, das es evolutionär am Anfang der Annexine der A-Familie steht (IGLESIAS et al. 2002). Auch bei diesem Annexin-Gen weist die 3'-Spleißstelle des ersten Exons eine atypische Sequenz auf (CGTCAT-3').

Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Teilsequenz (Abb. 33 magentafarben) tatsächlich um ein Intron in Klon MH6/1-8i1 bei *M. sexta* handelt, so dass offenbar eine noch nicht fertig prozessierte prä-mRNA des Annexin-Gens einkloniert wurde. Möglicherweise sollten hier ursprünglich auch noch andere Exons herausgeschnitten werden, so dass letztendlich eine „reife“ mRNA für Isoform B oder C des Annexins vorliegen könnte. Darüber kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage getroffen werden.

Ein *Alignment* mit dem Annexin IX-Gen von *B. mori* unterstützt diese These: Bei *B. mori* liegt im gleichen Sequenzabschnitt (Position 567 nt bei *M. sexta*, Position 589 nt bei *B. mori*) ein Intron von insgesamt drei vorhandenen Introns vor. Ein Vergleich der beiden Intronsequenzen weist auch hier gewisse Übereinstimmungen auf, insbesondere am 5'- und am 3'-Ende des Introns. Zwischen den jeweiligen Sequenz-spezifischen Nukleotidsequenzen der Isoformen befinden sich im *B. mori*-Gen keine Introns. Auch das Annexin X-Gen von *D. melanogaster* besteht aus vier Exons und drei Introns. Gerade die Positionen des zweiten und des dritten Introns gelten dort als sehr konserviert im Vergleich mit Annexin-Genen von Vertebraten (BENEVOLENSKAYA et al. 1995)

#### 4.6.3.3 Molekulargewicht, isoelektrischer Prunkt und Hydrophobizität des *M. sexta*-Annexin IX

Das mit Computer-gestützten Programmen vorhergesagte **Molekulargewicht** der drei unmodifizierten *M. sexta*-Annexin-Isoformen beläuft sich auf etwa 35,8 k. Das mittels Gelelektrophorese und Western Blot ermittelte Molekulargewicht lag in einem Bereich von ca. 33 k bis 34 k. Obwohl die Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE nur einen ungefähren Richtwert geben kann, stimmt das in dieser Arbeit so ermittelte Molekulargewicht relativ gut mit dem theoretisch ermittelten überein. Auch Annexine anderer Insekten bzw. Invertebraten weisen ähnliche relative Molekulargewichte auf, z. B. für Annexin IX von *B. mori* 36 k (XIA et al. 2001), für Annexin X von *D. melanogaster* 35 k (JOHNSTON et al. 1990) und Annexin XII von *Hydra vulgaris* 33 k (SCHLAEPFER et al. 1992). Die meisten der monomeren Vertebraten-Annexine weisen ein Molekulargewicht zwischen 35 k und knapp 40 k auf (BARNES & GOMES 2002, RAYNAL & POLLARD 1994).

Ob die beiden mit dem Antikörper detektierbaren Banden, zwei Isoformen sind oder die eine Bande ein Abbauprodukt der anderen ist, kann nur durch weitere Analysen, z. B. durch Verdauungsexperimente oder Deglykosylierungsversuche verifiziert werden. Mittels DEAE-Zellulose eluiertes humanes Annexin A9, das in Bakterien exprimiert wurde, weist im Western Blot unter Verwendung eines anti-Annexin A9-Antikörper ein Molekulargewicht im Bereich zwischen 32,5 k und 47,5 k auf. Auf dem bei GOEBELER et al. (2003) dargestellten Blot erscheint ebenfalls noch eine zweite schwächere Bande knapp unterhalb von 32 k, auf die dort jedoch nicht weiter eingegangen wird.

Die Möglichkeit, dass es zur Abspaltung eines Signalpeptids kommen könnte und deshalb auch ein Annexin-Protein mit geringerem Molekulargewicht im Western Blot auftaucht, konnte durch die Überprüfung mittels des Computerprogramms „SignalP“ nicht bestätigt werden (Kap. 3.4.5.4). Die meisten Annexine von Säugern besitzen eine sog. PEST-Sequenz, d.h. im N-terminalen Bereich befindet sich eine Region, die reich an den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist. Man nimmt an, dass sie als Signal für die schnelle intrazelluläre Degradation der Proteine dient. So ist von humanem Annexin I bekannt, dass es durch Calpain in der Nähe der PEST-Region gespalten wird. Es wird angenommen, dass diese Region als Calpain-Erkennungsstelle dient. Außerdem

weisen acht der zehn bekannten Säuger-Annexine eine Pentapeptid-Sequenz auf, die biochemisch mit dem KFERQ-Motiv (Aminosäuren Lysin, Phenylalanin, Glutamat, Arginin, Glutamin) verwandt ist, das als Signal für die lysosomale Proteolyse von Proteinen gilt (BARNES & GOMES 2002). Humanes Annexin 2 hingegen ist im extrazellulären Milieu gefunden worden, obwohl es keine Signalsequenz für seine Sekretion enthält. Die Sekretion ist mit der von Katecholaminen korreliert und unabhängig vom Zelltod. Offenbar wird es bei der Membranruptur im Zuge von Exozytosevorgängen freigesetzt (FAURE et al. 2002).

Der theoretisch ermittelte **isoelektrische Punkt** der drei unmodifizierten *M. sexta*-Annexin-Isoformen liegt bei etwa 4,9. Erst in der zweiten Nachkommastelle dieses Wertes treten Unterschiede zwischen den drei Isoformen auf. Dies dürfte auch mit einer zweidimensionalen Gelelektrophorese nur ansatzweise in Form von ineinanderfließenden Spots dokumentierbar sein.

Der vorhergeagte isoelektrische Punkt der meisten Vertebraten-Annexine liegt im pH-Bereich um 5,5 (z. B. humanes Annexin 31 syn. Annexin A9 pI = 5,53; humanes Annexin V pI ca. 5,0). Es gibt jedoch auch Annexine mit deutlich höheren isoelektrischen Punkten wie beispielsweise Annexin II und XII mit einem pI von etwa 7,5 (Zusammenstellung der isoelektrischen Punkte aller Vertebraten- 4 bei MORGAN & FERNANDEZ 1998)

Untersuchungen zur **Hydrophobizität** der drei Isoformen des *M. sexta*-Annexin IX ergaben keine längeren stark hydrophoben oder hydrophilen Bereiche, was für einen Bereich sprechen würde, der mit einer Phospholipidmembran assoziiert ist (siehe Fig. 5 bei KYTE & DOOLITTLE 1982), oder bei längerer hydrophiler Sequenz weit in das Zytoplasma oder in den extrazellulären Raum herausragen würde. So wurden für das *M. sexta*-Annexin IX keine Transmembran-Helices vorausgesagt. Die abwechselnden Peaks im hydrophilen und hydrophoben Bereich sprechen eher für eine Faltung des Proteins, bei der sich innere und äußere Bereiche abwechseln. Allein das C-terminale Ende unterscheidet die Isoformen. So könnte bei Isoform A eine hydrophile Schleife aus dem Protein ins Zytoplasma hineinragen. Bei Isoform C könnte ein ähnliches Muster vorliegen, wobei eine potenzielle ins Zytoplasma ragende Schleife weniger stark ausgeprägt sein mag. Der C-terminale Teil von Isoform B hingegen ist überwiegend hydrophob, so dass

hier vermutet wird, dass er sich im Inneren des Proteins befindet oder aber er könnte eine potenzielle – allerdings sehr lose – Verankerung in einer Membran vermitteln. Die bei XIA et al. (2001) beschriebenen drei *B. mori*-Annexin-Isoformen weisen nach Überprüfung mit dem gleichen Programm nahezu identische Hydrophobizitätskurven mit denen von *M. sexta* auf. Auch im Isoform-spezifischen Bereich gleichen sich die jeweiligen Hydrophobizitätskurven. Die Autoren machen jedoch keine Aussage darüber, ob die hydrophoben Eigenschaften des Proteins für die Struktur oder Funktion eine Rolle spielen.

Aussagen zur dreidimensionalen Struktur des *M. sexta*-Annexin IX sind ohne Röntgenstrukturanalyse spekulativ und werden hier nicht vorgenommen. Strukturvergleiche mit den Daten aus den Proteindatenbanken sind mit äußerster Vorsicht zu betrachten, da es sich bei den bisher analysierten Annexinen überwiegend um die der A-Familie (Vertebraten) handelt und trotz des Vorhandenseins der Gruppe den Namen gebenden Annexin-Domänen zwischen ihren Mitgliedern eine Vielfalt herrscht. Dennoch ergab sich der Hinweis, dass *M. sexta*-Annexin IX eine 40 bis 50%ige Ähnlichkeit mit 3D-Modellen von Annexin IV und VI von *Bos taurus*, Annexin I, III und V von *Homo sapiens* und Annexin XII von *H. vulgaris* besitzt (Vorhersage mit dem Programm 3D-PSSM Version 2.6.0 [KELLEY et al. 2000]).

#### 4.6.3.4 Annexin-Domänen und Bindungsmotive

Das *M. sexta* Annexin IX-Protein weist vier für Annexin typische Domänen (*annexin repeated domains*) von jeweils 67 aa (Domänen 1, 2 und 4) bzw. 68 aa (Domäne 3) auf. Dies gilt auch für die Mehrzahl der bisher bekannten Annexine mit etwa 70 aa pro Domäne (SMITH & MOSS 1994). Eine Ausnahme ist Annexin VI (Annexin A6) mit acht solcher Domänen, die vermutlich durch Genduplikation entstanden sind (BARTON et al. 1991). Das Konsensusmotiv für die Annexin-Domänen stimmt für die erste Domäne des *M. sexta*-Annexin überein. Auch bei der dritten und vierten Domäne finden sich deutliche Übereinstimmungen. Ausnahmen bestehen bei einer Aminosäure in Domäne 3 (Position 242 in Abb. A9 im Anhang: Glycin [G] statt Leucin [L] bzw. statt Isoleucin [I], Valin [V], Methionen [M] oder Phenylalanin [F]) und zwei Aminosäuren bei Isoform-A in Domäne 4 (Position 314: Tyrosin [Y] statt L bzw. statt I, V, M, F oder Alanin [A]; Position 317: A statt L bzw. statt I, V, M oder F). In Domäne 2 ist das komplette Annexin-Motiv nicht vorhanden. Es wird jedoch diskutiert, dass das Sequenzmuster nicht bei



allen *repeated domains* der Annexine IX, X, XI und XII zu finden ist (*NiceSite View* der Prosite Dokumentation zu *Annexins repeated domain signature*, FIEDLER et al. 1995).

Bei *M. sexta* weisen die Domänen 1, 2 und 4 je fünf, Domäne 3 sechs  $\alpha$ -Helices auf, die mit dem Programm „PSIPRED“ ermittelt wurden.

Zwei Anmerkungen sollen an dieser Stelle nicht erwähnt werden:

(1) Für die Motivsuche wurde das Programm „MyHits“ verwendet, das auf die Prosite- und Pfam-Datenbanken zurückgreift. Je nach verwendetem Programm und Datenbank, die benutzt wird, kann das Ergebnis für die Lokalisation der Annexin *repeated domains* etwas unterschiedlich sein, so dass die Daten der Domänen in dieser Arbeit von anderen Literaturdaten (z. B. XIA et al. 2001) abweichen können.

(2) Das *M. sexta*-Annexin IX wurde auch im Rahmen des Programms 3D-PSSM auf  $\alpha$ -Helices hin untersucht. Das Ergebnis weicht etwas von dem in Abbildung A9 im Anhang dargestellt ab: So weisen die Annexin-Domänen 1 bis 3 zwar jeweils fünf  $\alpha$ -Helices auf, Domäne 4 jedoch nur vier sowie ein  $\beta$ -Faltblatt und zwar nur für die Isoformen A und C, während bei Isoform B alle vier Annexin-Domänen je 5  $\alpha$ -Helices aufweist. Es kann nicht erklärt werden, wieso ein Bereich, der bei allen drei Isoformen identisch ist, mit dem selben Programm einmal als  $\alpha$ -Helix und zweimal als  $\beta$ -Faltblatt ausgewiesen wird. Jedoch wird dadurch ersichtlich, dass die Vorhersagen solcher Programme mit Vorsicht betrachtet werden müssen.

Für die drei Isoformen von *B. mori* sind nach XIA et al. (2001) ebenfalls pro Annexin-Domäne jeweils fünf  $\alpha$ -Helices vorausgesagt worden (verwendetes Programm: DNASIS). Einzige Ausnahme bildet Isoform B mit nur vier  $\alpha$ -Helices in Domäne 4. Unter Vernachlässigung der eben erwähnten Abweichungen, kann festgehalten werden, dass auch das *M. sexta*-Annexin IX dem allgemeinen Schema von fünf  $\alpha$ -Helices pro Domäne entspricht. Des Weiteren wurden ein N-Glykosilierungsmotiv, Caseinkinase II- und Proteinkinase C-Phosphorylierungsmotive sowie Myristylierungsmotive vorausgesagt, wenn auch mit einer gewissen Unsicherheit. Die Anzahl der jeweiligen Motive differiert bei den einzelnen Isoformen leicht, was auf die Unterschiede im C-terminalen Sequenzbereich zurückzuführen ist. Auch ein KGD-Motiv sowie das Typ II-Calciumbindungsmotiv (G-x-GTDE-x(36)-[ED]) wurden gefunden. Bis auf zwei Myristylierungsstellen und

zwei Caseinkinase II Phosphorylierungsmotive und liegen alle Motive im Bereich der Annexin-Domänen (Abb. A10 im Anhang).

Voraussetzung für eine Myristylierung ist ein N-terminaler Glycin-Rest. Interne potenzielle Myristylierungsstellen finden sich aber auch in viralen Polyprotein-vorläufern, die nach proteolytischer Prozessierung dazu führen, dass das interne Glycin eine N-terminale Position im reifen Protein einnimmt (*NiceSite View* der Prosite-Dokumentation für *N-myristoylation site*). Bei *M. sexta* liegen die vorhergesagten Myristylierungsmotive nicht endständig vor. Möglicherweise handelt es sich bei denen mit „MyHits“ postulierten Myristylierungsmotive auch um falsch-positive Hits. Andererseits wird auch für das humane Annexin 31 (syn. Annexin A9) eine Myristylierung im N-terminalen Bereich vorausgesagt. Bei Annexin 31 liegt ebenfalls kein endständiges Glycin vor (MORGAN & FERNÁNDEZ 1998). Über die Anheftung der gesättigten Fettsäure Myristinsäure können Proteine an Membranen gebunden werden (RESH 1999). Annexin A13 verschiedener Vertebraten-Spezies weist N-terminal ein Myristylierungsmotiv auf (IGLESIAS et al. 2002).

Glykosylierung durch Anheftung und anschließender Prozessierung von Kohlenhydratketten ist eine häufige Modifizierung von Plasma- und Sekretproteinen (LODISH et al. 2001).

Caseinkinase II ist eine ubiquitär in Eukaryoten vorkommende Serin-Threonin-Proteinkinase, die viele verschiedene Proteine phosphoryliert und somit in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse wie Mitose und zelluläre Transformation involviert ist. Ihre Aktivität ist unabhängig von zyklischen Nukleotiden und von Calcium (*NiceSite View* der Prosite-Dokumentation für *Casein kinase II phosphorylation site*; *Technical Bulletin No. 514*, [www.promega.com](http://www.promega.com)). Es wird vermutet, dass Caseinkinase II eine Rolle bei der Inhibition der Apoptose bei T-Lymphozyten spielt (<http://www.vimm.it/Research/Projects/Pinnaproject>).

Potenzielle Phosphorylierungsmotive für Proteinkinase C und Caseinkinase II wurden neben Myristylierungsstellen auch für Annexin XIIIb (MDCK-Zellen) postuliert (Fiedler et al. 1995, LAFONT et al. 1998). Humanes Annexin 31 weist ebenfalls diese Motive auf sowie ein N-Glykosylierungsmotiv und ein KGD-Motiv (MORGAN & FERNÁNDEZ 1998). Auch Annexin I, II und IV besitzen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C auf (ROTHHUT 1997). Man nimmt an, dass Calcium, GTP (Guanosintriphosphat) und Proteinkinase C zusammen die

Aktivität von Annexin 7 an Membranfusionen während der Exozytose verstärken (CAOHUY & POLLARD 2002).

Für das *B. mori*-Annexin IX, das die größte Übereinstimmung mit dem von *M. sexta* aufweist, wird aufgrund der ähnlich C-terminalen Teilsequenzen mit Annexin I dort eine Bindungsstelle für Proteinkinase C postuliert, wobei allerdings gerade bei *B. mori* dieser Bereich sich bei den einzelnen Isoformen unterscheidet (XIA et al. 2001).

KGD-Motive finden sich auch bei anderen Annexinen (Annexin A1, A2, A9 und A13). Sie sprechen für eine intermolekulare Interaktion des Proteins mit anderen Proteinen (MORGEN & FERNÁNDEZ 1998, IGLESIAS et al. 2002, MOSS & MORGAN 2004). Bei Crustaceen ist ein solches Adhäsions- bzw. Integrinbindungsmotiv bekannt (SRITUNYALUCKSANA et al. 2001). Zum Beispiel weist das Peroxinectin von *Pacifastacus* ein KGD-Motiv auf, an das der Transmembranrezeptor der Integrin-Familie auf Blutzellen bindet (JOHANSSON 1999).

Calcium-Bindungsmotive finden sich bei Annexinen in den vier *annexin repeated domains*. Sie sind für die Calcium-abhängige Membranerkennung und -bindung verantwortlich. Es kommen verschiedene Typen vor; Typ II weist die höchste Affinität für Calcium auf (MONTAVILLE et al. 2002) und liegt beispielsweise bei *B. mori* (XIA et al. 2001) und bei dem hier untersuchten Annexin IX von *M. sexta* vor. Das Calcium-Bindungsmotiv GXGTDE wird bei Annexinen auch „*Endonexin fold*“ genannt (KOURIE & WOOD 2000).

#### **4.6.4 Nachweis von Annexin IX bei *M. sexta* und anderen Insekten**

Bei *M. sexta* konnte Annexin IX mittels Western Blot im Hämozyten- und Fettkörperlysat nachgewiesen werden. Es konnte ebenso auf Hämozyten-Monolayern detektiert werden sowie in *Whole-mount*-Präparaten des Fettkörpers, der Integumentinnenseite und des Darmepithels.

Bei den Hämozyten-Monolayern ließ sich das Vorhandensein von Annexin IX in allen Zelltypen belegen. Es trat im Zytoplasma und besonders bei den Plasmatozyten im Membranbereich auf, in den gerade sich bildenden Pseudopodien der Plasmatozyten jedoch deutlich schwächer. Eine potenzielle Bindung bzw. Adhäsion an die Hämozytenmembran kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch in oder an der Zellmembran von Fettkörperzellen kommt

Annexin IX offenbar reichhaltiger vor als im Zytoplasma. Auf den Ganztierschnitten konnte Annexin ebenfalls in allen Geweben nachgewiesen werden. Keine Struktur war besonders auffällig markiert.

Ein „gesprenkeltes“ Muster, das anti-Annexin-Antikörper von *M. sexta* auf Plasmatozyten markiert, findet sich in ähnlicher Weise auch auf BHK-Zellen (*baby hamster kidney cells*), die mit einem Antikörper gegen Annexin II markiert wurden (MAYRAN et al. 2003). Annexin II wird dort im Zytoplasma, an der Plasmamembran sowie auf frühen Endosomen nachgewiesen und scheint des Weiteren Transporte von frühen zu späten Endosomen zu regulieren und insgesamt eine endosomale Plattform für die Reorganisation von Membranen zu sein, die zur Bildung von multivesikulären Endosomen führt.

Annexine werden auch bei Säugern in allen Geweben (Ausnahme: rote Blutkörperchen) exprimiert (BARNES & GOMES 2002).

Die Ergebnisse sprechen für ein generelles Vorkommen des *M. sexta*-Annexin IX in allen Geweben. Eine differenziertere über die Lichtmikroskopie hinausgehende Untersuchung z. B. mit einem goldmarkierten anti-Annexin-Antikörper im Elektronenmikroskop (VARNELL et al. 1982) könnte jedoch noch einen genaueren Aufschluss über die Lokalisation des Annexin in einzelnen Zellen beispielsweise des Fettkörpers oder bei den verschiedenen Hämozytentypen liefern. Ultrastrukturelle Untersuchungen des Annexin B7 von *C. elegans* konnten beispielsweise klären, dass das Protein mit einer distinkten Gruppe von Zellen assoziiert ist u. a. im Membransystem der sekretorischen Drüsen des Pharynx (CREUTZ et al. 1996).

Da die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate von infizierten und unbehandelten Larven keine Unterschiede aufwies, muss zunächst davon ausgegangen werden, dass die Infektion von Larven mit Gram-positiven Bakterien offenbar keinen Einfluss auf das Vorhandensein von Annexin IX bei *M. sexta* hat, auch wenn sich im Western Blot Annexin IX im Fettkörper von Larven, denen *B. megaterium* injiziert worden war, stärker nachweisen ließ als beim Fettkörper unbehandelter Larven.

DE GREGORIO et al. (2001) untersuchten in einer das Gesamt Genom betreffenden Analyse die Immunantwort von *Drosophila* mittels Oligonukleotid-Microarrays. Sie analysierten dabei das Expressionsprofil von adulten Fliegen nach mikrobieller

Infektion mit *E. coli* und *M. luteus* sowie nach Infektion mit dem entomopathogen Pilz *Beauveria bassiana*. Annexin IX wurde nach Infektion stärker exprimiert als bei naiven Tieren. Dies traf besonders nach einer bakteriellen Infektion zu, wobei die Expression in der Zeitspanne zwischen 1,5 h und 48 h nach der Infektion abnahm.

Bei in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen markierte mAk MS#78 auch Hämocyten anderer Insekten. So band der Antikörper jeweils an alle Hämocyten auf Monolayern von anderen Lepidopteren wie *Galleria mellonella* (L7), *B. mori* (L5), *Acherontia atropos* (L5), *Actias artemis* (L5). Die Reaktion fiel jedoch bei I(2)mbn-Zellen aus einer *D. melanogaster*-Zellkultur negativ aus. Hämocytenlysat von *G. mellonella* erwies sich im Western Blot als positiv, das totale Lysat von Larven der Arten *D. melanogaster* (Diptera) und *Cotesia glomerata* (L3, Hymenoptera) hingegen war negativ (persönliche Mitteilung, M. KLANG). Ob damit tatsächlich auch Annexin bei den angeführten Spezies nachgewiesen wurde, muss letztendlich noch bewiesen werden. Die Möglichkeit, dass ein monoklonaler Antikörper, der ursprünglich gegen Hämocyten von *M. sexta* gewonnen wurde, auch bei Hämocyten einiger anderer Insektenspezies positiv reagiert, spräche für eine hohe Konservierung des Annexins innerhalb der Insekten, insbesondere der Antikörperbindungsstelle. Der Bereich, in dem die Antikörperstelle liegt, ist bei *M. sexta* zwischen den Aminosäurepositionen 107 und 307 (z. B. Abb. A8 im Anhang) lokalisiert. In diesem Sequenzbereich liegen Teile der zweiten und vierten Annexin-spezifischen Domäne sowie die dritte Domäne. Die Domänen sind sehr konservierte und für Annexine typische Motive. Dies spricht für die Annahme eines Nachweises von Annexin bei anderen Insektenspezies. Über die genauere Lokalisierung des Epitops bei *M. sexta* kann aufgrund der vorliegenden Daten keine Aussage gemacht werden. Es ist jedoch auch möglich, dass die für die Antikörperbindung entscheidene Bereiche sich auf die Sequenzen zwischen den Annexin-Domänen beschränken. Außerdem liegt im Bereich der Antikörperbindungsstelle auch ein KGD-Motiv. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so wäre es unter Umständen möglich die KGD-Bindungsstelle durch den monoklonalen Antikörper MS#78 zu hemmen und diese Möglichkeit für weitergehende Studien auszunutzen.

#### 4.6.5 Betrachtungen zur potenziellen Funktion von Annexin

Über die Funktion des Annexin IX von *M. sexta* kann bislang nur spekuliert werden. Die als Annexin IX-A, -B bzw. -C benannten Isoformen von *B. mori* wurden in verschiedenen Geweben unterschiedlich häufig nachgewiesen. So konnte das Vorhandensein der A-Isoform für Testes, Ovarien, Hämolymphe und schwächer auch für Epidermis und Mitteldarm von Larven (L5d3) sowie für alle weiteren Entwicklungsstadien (Eier, Puppe, Imago) belegt werden. Die C-Isoform wurde darüber hinaus noch in den Tracheen, der Seidendrüse und den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen. Die C-Isoform wurde überall gleich intensiv exprimiert. Isoform B tritt zwar auch in allen untersuchten Geweben und Stadien auf, aber in der Seidendrüse, den Diapause-Eiern und der Imago nur in geringen Mengen (XIA et al. 2001). Deshalb wurde postuliert, dass Annexin IX-C hier eine sehr ursprüngliche Funktion besitzt, während die A- und B-Isoformen eher gewebespezifische bzw. entwicklungsspezifische Funktion, speziell Annexin IX-B in der Diapause, ausüben. Außerdem wird ein Zusammenhang mit Proteinkinase C vermittelter Signaltransduktion angenommen.

Annexin B13 von *B. mori* ist vermutlich an der Ausbildung der Flügel beteiligt, da es besonders in den Flügelscheiben des Wildtyps exprimiert wird, jedoch bei der Mutante *flügellos* vollkommen reprimiert wird (MATSUNAGA & FUJIWARA 2002). Für den Annexin-Typ, für den die Sequenzen EN16 bzw. 16b kodieren, wird eine potenzielle Beteiligung am Ablauf des programmierten Zelltods durch Inhibition von Caspasen vermutet (TSUZUKI et al. 2001). Die Expression wird hier durch 20-Hydroxyecdysol in den vorderen Seidendrüsen induziert.

Annexin X von *D. melanogaster* wurde bei JOHNSTON et al. (1990) hauptsächlich in Imagines und frühen Embryonen (0–2 h) exprimiert, nicht jedoch in späten Embryonen (2–4 h) und im dritten Larvenstadium. Die Expression in frühen Embryonen wird auf maternale Komponenten zurückgeführt. Annexin IX hingegen wurde in allen Entwicklungsstadien exprimiert. Bei Annexin X handelt es sich um ein lösliches Protein, auch in Gegenwart hoher Calciumkonzentrationen. Beide Annexine liegen bei *D. melanogaster* auf verschiedenen Chromosomen. Annexin IX auf Chromosom 3 an Position 93B und Annexin X auf dem X-Chromosom an Position 19A-4,7. JOHNSTON et al. (1990) vermuteten für *D. melanogaster* Annexin X eine eher generelle Funktion bei allen Zelltypen und mehrzelligen Organismen wie es XIA et al. (2001) für Annexin IX-C von *B. mori*

beschreiben. Einzelne Annexine sollen zell- bzw. entwicklungsspezifische Funktionen ausüben.

#### **4.6.6 Ausblick der Annexin-Untersuchungen**

Ein letztendlicher Beweis, ob es sich bei den aus den cDNA-Banken isolierten Sequenzen tatsächlich um diejenigen für *M. sexta*-Annexin IX handelt bzw. ob die theoretische Translation in die Aminosäuresequenz auch mit der Realität übereinstimmt, muss noch erbracht werden. Dies kann z. B. geschehen, indem das Protein mittels des vorhandenen Antikörpers aus Hämocyten und/oder Fettkörper isoliert, aufgereinigt und sequenziert wird. Weiterhin kann bisher über die Funktion des *M. sexta*-Annexins nur spekuliert werden. Die allein bei *B. mori* so unterschiedlichen Funktionen der Annexine, lassen für *M. sexta* keinen generellen Schluss zu. Hinweise zur Orientierung können molekularbiologische Nachweise der Annexin IX-mRNA in verschiedenen Geweben (Darm, Nerven, Malpighische Gefäße, Geschlechtsorgane) und Stadien (Embryonen, verschiedene Larvenstadien, Puppe, Imago) mittels *in-situ*-Hybridisierung ergeben. Weiterhin könnte die Hemmung der Genaktivität mittels RNAi-Technik über die Funktion des Proteins Aufschluss geben. Jedoch lassen erste Ergebnisse zum Vorkommen von Annexin IX bei den verschiedensten Insekten zumindest auf eine generellere Verbreitung unter den Insekten schließen wie dies für die Annexine bei den Vertebraten der Fall ist.

#### **4.7 Diskussion der Ergebnisse des EST-Projekts**

Um Proteine zu ermitteln, die an der zellulären Immunabwehr beteiligt sein könnten, wurden zufällig ausgewählte Klone der Hämocyten-cDNA-Bank ansequenziert.

Insgesamt wurden 90 Klone untersucht. Die Klone G01 bis G06 wurden mit dem anti-Annexin-Antikörper beim Screening der cDNA-Banken aus Fettkörper und Hämocyten isoliert (Kap. 3.4.2ff) und im Rahmen des EST-Projekts zur Kontrolle der bisherigen Sequenzdaten zu diesen Klonen nochmals ansequenziert.

Bei der Auswertung der Sequenzen traten z. T. unterschiedliche Blast-Ergebnisse für die beiden Enden einer Sequenz auf. Außerdem wichen teilweise die

Ergebnisse des Nukleotid-Blasts von denen des Protein-Blasts ab. Einige der Sequenzen wurden vom ausführenden Labor zweimal sequenziert und erscheinen in der Tabelle als RPT, da offenbar die Qualität der Erstsequenzierung nicht gut genug war.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse des EST-Projektes mit einem P-Wert von  $\leq 1 \text{ e}^{-50}$  oder wenn Ähnlichkeiten zu anderen *M. sexta*-Sequenzen oder -Proteinen auftauchten diskutiert, da höhere Werte auch für eine zufällige Wahrscheinlichkeit gleicher Sequenzabschnitte sprechen könnten. Nicht weiter diskutiert werden Klone, deren Sequenzen, (1) denen von (Klonierungs-)Vektoren entsprachen, (2) solchen Sequenzen ähneln, für die bereits Patente angemeldet wurden, (3) nicht näher charakterisierte Proteine von *D. melanogaster* oder (4) von Bakterien repräsentieren. Es sind dies die Klone A05, A07, A08, A09, B09, B09 RPT, C06, E03, E10 RPT, H03 und H12.

55 Klone lieferten bei allen vier Blasts keine Ergebnisse unter dem oben gewählten Grenzwert (A01, A03, A06, A10-A12, B03-B08, B10-B12, C01-C03, C08-C09, C11-C12, D01, D03-D04, D06, D08-D11, E01-E02, E04-E07, E11, F01, F03-F06, F08-F10, F12, G09-G10, H01-H02, H05, H08, H09-H11).

Alle anderen lieferten mindestens ein Ergebnis, das nachfolgend kurz besprochen wird (Angabe in Klammern entspricht der Klon-Nummer in Tab. B1 in Anhang B). Darunter sind Proteine, die am Immungeschehen beteiligt sind, Enzyme, Strukturproteine, Nukleinsäuren bzw. Proteine, die an sie binden, und Proteine, die an der Individualentwicklung beteiligt sind.

**Gloverin** (A02) ist ein bei *T. ni* am Immungeschehen beteiligtes Protein, das zunächst in seiner Pro-Form (Progloverin) existiert. Das reife Gloverin – ohne Signalsequenz und ein Prosegment – besitzt ein relatives Molekulargewicht von etwa 14 k. Bei *T. ni* konnte Gloverin in der Hämolymphe und in Hämozyten bakteriell infizierter Tiere nachgewiesen werden. Seine Expression wird durch die Infektion induziert und es weist eine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* auf (LUNDSTRÖM et al. 2002). Auch von *Helicoverpa armigera* (Mackintosh et al. 1998) und *Hyalophora gloveri* (Axén et al. 1997) sind Gloverine bzw. Gloverin-ähnliche Proteine bekannt. Es wurde gezeigt, dass Gloverin von *H. gloveri* mit LPS interagiert und speziell die Synthese der Proteine der äußeren Membran inhibiert, was die Permeabilität der Membran der Bakterien erhöht.



**Lysozym** (G07) und **Attacin** (G12) gehören zu den antimikrobiellen Proteinen und wurden bereits eingehend erläutert.

**Hämocytin** (G11) ist ein Lektin, dass an den nicht-adaptiven Abwehrmechanismen beteiligt ist. Eines der ersten Hämocyte wurde aus *B. mori* isoliert. Es besitzt C-terminal eine Kohlenhydraterkennungsdomäne und weist hämagglutinierende Eigenschaften auf (KOTANI et al 1995). Von *M. sexta* aus der selben Hämocyten-cDNA-Bank ebenfalls die Sequenz des Hämocytins isoliert SCHOLZ (2002).

**Proteasen** (B01 RPT, C05) wie die 26/29-kDa Protease aus Hämocyten von *Sarcophaga peregrina* hydrolysieren spezielle Proteine der Fettkörper-Extrazellulärmembran. Es wird vermutet, dass sie dort an der Eliminierung fremder Proteine mitwirkt und somit am Immungeschehen beteiligt ist. Sie gehört zur Familie der Papaine (FUJIMOTO et al. 1999).

**Serpine** (F05) sind Serin Protease Inhibitoren. Das Serpin Gen-1 von *M. sexta* kodiert für eine Familie von Serpinen, die nur in ihrem C-terminalen Ende variieren. Bei der genaueren Untersuchung des Gens wurde festgestellt, dass eines der Exons in verschiedenen Varianten vorkommt ist, so dass 12 verschiedene Serpin-Proteine entstehen können (JIANG et al. 1996).

Die Funktion der **Prophenoloxidase** bzw. der **Phenoloxidase** (B02, D05, E08) in der entsprechenden Enzymkaskade und ihr Aufbau wurde bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben.

Die **ATP-Synthase** (H06) – lokalisiert in den Mitochondrien – katalysiert die Umwandlung von ATP zu ADP, wenn ein Protonengradient über der Membran vorhanden ist. Die  $\beta$ -Kette ist dabei die katalytische Untereinheit (Basic UniProt Protein Viewer [http://www.ebi.uniprot.org/entry/ATPB\\_DROME](http://www.ebi.uniprot.org/entry/ATPB_DROME)).

**V-ATPasen** (Vakuolen-ATPasen, E12) sind ebenso Protonenpumpen, d. h. durch die bei der Hydrolyse von ATP frei werdende Energie wird ein gerichteter Protonen-Transport durch Membranen aufgebaut. Sie sind multimere Proteinkomplexe, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen (MERZENDORFER et al. 2000).

**Ribonukleotid Reduktasen** (B09) katalysieren die Synthese von Desoxyribonukleotiden. Sie bestehen aus zwei dimeren Untereinheiten. Es wurde nachgewiesen, dass z. B. die Aktivität der Ribonukleotid Reduktase von

*Mesocricetus auratus* (Hamster) bei Zelllinien, die gegen Hydroxyharnstoff resistent sind, besonders stark erhöht ist (CHAUDHURI et al. 1992).

Die Sequenz von Klon C06 weist eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Protein von *D. melanogaster* auf, das dem GTP-bindenden **Elongationsfaktor Tu** von Prokaryoten entspricht. Der Elongationsfaktor ist bei Prokaryoten am Transport von Aminosäuren von der P- zur A-Stelle im ribosomalen 70S-Initiationskomplex bei der Translation beteiligt. Dem prokaryotischen Elongationsfaktor Tu sowie einem weiteren Elongationsfaktor Ts entsprechen die eukaryotischen Elongationsfaktoren EF1 $\alpha$  (E09), z. B. bei *M. sexta* (REGIER et al. 2001), bei *D. melanogaster* (HOVEMANN et al. 1988) oder bei *B. mori* (Kamiie et al. 1993), und EF1 $\beta\gamma$  (STRYER 1999).

Das **Nukleotidbindende Protein** NUB1 des Menschen, das eine ähnliche Sequenz aufweist wie Klon C10, interagiert mit einem Ubiquitin ähnlichen Protein (NEDD8). Es wurde nachgewiesen, dass NUB1 an der Expression dieses Proteins beteiligt ist und selbst durch Interferon induziert wird und spezifisch in den menschlichen Testes, den Ovarien, dem Herzen und der Skelettmuskulatur exprimiert wird. NEDD8 wiederum scheint an vielen biologischen Funktionen beteiligt zu sein, darunter der NF $\kappa$ B-Signalkaskade und der Regulation des Zellzyklus, was die Bedeutung seiner Regulation unterstreicht (KITO et al. 2001).

Die Sequenz von Klon D02 ist mit denjenigen von **PolyA(Polyadenylat)-bindenden Proteinen** von *A. aegypti* und *M. musculus* vergleichbar. Es wurde gezeigt, dass dasjenige von *A. aegypti* in Larven, Puppen, erwachsenen Männchen und in erwachsenen Weibchen, denen der Mitteldarm herauspräpariert wurde, exprimiert wird, nicht jedoch im Mitteldarm der Weibchen (MORLAIS et al. 2003).

Die **ribosomale RNA** (F07, H04) setzt sich bei Eukaryoten aus der 60 S- und der 40 S-Untereinheit zusammen. Während die kleinere Untereinheit die 18 S-rRNA enthält, weist die größere drei RNAs auf, die 28 S-, 5,8 S- und die 5 S-rRNA. Die 18 S- und die 28 S-rRNA werden z. B. für phylogenetische Vergleichsstudien benutzt (z. B. WHITING 2002).

Der *Gart* Locus bei *Drosophila* ist ein **Polypeptid-Gen** (F02 RPT), das drei Enzyme kodiert, die an der **Purinsynthese** beteiligt sind. Außerdem kodiert es ein Kutikulaprotein der Puppen. Die Gene für die einzelnen Proteine liegen hier ineinander verschachtelt vor (HENIKOFF & EGHTEDARZADEH 1987).

**Tubulin** (A04, C07) ist der Grundbaustein für Mikrotubuli. Es besteht aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Von *B. mori* sind mehrere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline kloniert worden (KAWASAKI et al. 2003). Auch von *M. sexta* wurden  $\beta$ 1-Tubuline kloniert. Es wurde nachgewiesen, dass die Synthese des  $\beta$ 1-Tubulins durch das Prothorakotrope Hormon stimuliert werden konnte. Es wird zwar in allen Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert, die Regulation von Transkription und Translation ist dort jedoch unterschiedlich (RYBCZYNSKI & GILBERT 1998). Bei *Chironomus tentans* wurde  $\alpha$ -Tubulin 1 als ein Protein beschrieben, dessen Synthese Cadmium-abhängig reguliert ist. Das  $\alpha$ -Tubulin 1 wurde in allen Geweben und Entwicklungsstadien nachgewiesen (MATTINGLY et al. 2001). Bei *D. melanogaster* wurden vier Gene für  $\alpha$ -Tubulin gefunden. Zwei davon werden konstitutiv exprimiert, während die anderen beiden nur in bestimmten Geweben vorkommen (THEURKAUF et al. 1986).

**Aktine** (C04, D12) gehören ebenso wie Tubulin zu den Proteinen, die am Aufbau des Zytoskeletts bei allen Eukaryoten beteiligt sind. Sie sind an verschiedenen zellulären Ereignissen wie z. B. dem Transport von Organellen sowie der Endo- und Exozytose beteiligt. Das A4 Gen für zytoplasmatisches Aktin – eines von vieren – wird in allen larvalen Geweben von *B. mori* exprimiert. Die Struktur des A3 und A4 Gens ähneln sich so stark, so dass vermutet wurde, dass beide durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorgänger-Gen entstanden sind (MANGÉ et al. 1996). Letzteres gilt auch für die Aktin-Gene A3a und A3b von *H. armigera*. Sie scheinen an Entwicklungsvorgängen während des Puppenstadiums und kurz nach dem Schlüpfen der Imago beteiligt zu sein (ROURKE & EAST 1997). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expression der schweren Ketten von Aktin und Myosin bei *M. sexta* während der Apoptose der Intersektalmuskulatur im Verlauf der Metamorphose reprimiert wird (SCHWARTZ et al. 1993).

Die Sequenz von Klon A09 weist eine gewisse Ähnlichkeit zu einem **T-Komplex-Polypeptid** von *Aedes triseriatus* auf, das ein potenzielles **Chaperonin** enthält. Es ist an der ATP-abhängigen Faltung und am Zusammenbau von Aktin und Tubulin nach der Translation beteiligt (BLITVICH et al. 2001).

**Lakunin** (H07) ist ein extrazelluläres Matrixprotein. Es wurde gezeigt, dass es bei *M. sexta* am Aufbau epithelialer Monolayer in Embryonen und an der Entwicklung der Flügel beteiligt ist (NARDI et al. 1999). Es konnte in der Basallamina und in granulären Zellen nachgewiesen werden, in denen es nicht nur exprimiert wird,

sondern auch endozytiert wird, wenn alte Basallamina abgebaut wird (NARDI et al. 2001).

Insekten weisen einen ausgesprochen guten Geruchssinn auf. Die Duftmoleküle werden von so genannten **Duftmolekül-bindenden Proteinen** (C08 RPT) zu olfaktorischen Rezeptoren transportiert und dort von Duftmolekül-degradierenden Enzymen abgebaut. Bei *M. sexta* wurde gezeigt, dass solche Duftmolekül-bindenden Proteine in den Antennen und Maxillen von weiblichen und männlichen Imagines exprimiert werden (VOGT et al. 2002).

Calponin ist ein Calmodulin. Es wird angenommen, dass es an der Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligt ist, da es beim Menschen an Tropomyosin und F-Aktin bindet. Bei *Drosophila* wurde ein **Calponin-ähnliches Protein** (F11) gefunden (EDWARDS K. A. & YAMAMOTO D., *Drosophila* calponin homology domain protein at 64AB (Chd64), unveröffentlicht).

Für das so genannten *Chickadee*-Protein bzw. **Profilin** von *D. melanogaster* wurde eine Beteiligung am interzellulären Zytoplasmatransport während der Oogenese vermutet (COOLEY et al 1992). Es ist außerdem ein Aktin-bindendes Protein, das für die Polymerisierung wichtig ist.

Das Prothorakotrope Hormon, ein Neuropeptid, stimuliert die Synthese des Ecdysteroidhormons. Dies geht mit der Synthese weiterer Proteine einher, u. a. der **Hitzeschock verwandten Proteine** (*heat shock cognates*, G08). Es wird postuliert, dass bei *M. sexta* ein solches Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 70 k in die Regulation des Ecdysonrezeptorkomplexes involviert ist (RYBCZYNSKI & GILBERT 2000).

Juvenilhormone regulieren das Wachstum und die Entwicklung von Larven und die Reproduktion in Imago. Der Transport in die Peripherie geschieht über die Hämolymphe mittels **Hämolymphe-Juvenilhormon-bindender Proteine** (D09, F05, F05, F06), die unterschiedliche Affinitäten und Kapazitäten zum Juvenilhormon aufweisen (YOUNG et al. 2003).

Die Expression des **Häutungshormons** (= Eclosionshormon, F05) bei Insekten setzt verschiedene Vorgänge, die letztendlich zur eigentlichen Häutung, dem Schlüpfen aus der alten Exokutikula, führen, in Gang. Bei *M. sexta* wurde es in Larven, Puppen in der Diapause sowie in bestimmten Geweben von adulten Tieren exprimiert (HORODYSKI et al. 1989).

Für weitere Untersuchungen scheinen sowohl die Klone interessant zu sein, zu denen keine vergleichbaren Sequenzen gefunden werden konnten als auch solche, für die nur vergleichbare Sequenzen aus anderen (Insekten-)Spezies vorlagen, da es sich dabei um neue noch nicht untersuchte Gene bzw. Proteine von *M. sexta* handeln könnte.

Es wird hier angemerkt, dass in der Zeit zwischen den ersten Sequenzvergleichen und dem Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit, viele weitere Sequenzen in die NCBI- bzw. EMBL-Datenbanken gestellt wurden. So sind inzwischen von kooperierenden Arbeitsgruppen, die ebenfalls an *M. sexta* arbeiten, verschiedene Sequenzen ermittelt worden. Damit ist das Fehlen von *M. sexta*-Sequenzen in der Liste der Blast-Ergebnisse, ohne einen neuen Abgleich heute nicht mehr mit einer Neuentdeckung einer *M. sexta*-Sequenz gleichzusetzen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass *B. megaterium* ein genauso wirksamer Provokator des Immunsystems von *M. sexta* ist wie *E. coli*. Auch Zellwandmaterial und Peptidoglykanfragmente < 10 k von *M. luteus* sind dafür geeignet.

Lysozym kann Gram-positive Bakterien unterschiedlich schnell lysieren. So ist *M. luteus* mit einem Peptidoglykan vom Lys-Typ wesentlich sensibler gegenüber Lysozym als *B. megaterium*, das wie Gram-negative Bakterien Peptidoglykan des DAP-Typs besitzt. Die Hämolymphe von unbehandelten *M. sexta* Larven weist unterschiedliche z. T. ausreichend bakteriolytische Aktivität auf, um Bakterien mit Lys-Peptidoglykan sehr schnell zu lysieren.

*B. megaterium* wurde sowohl von Plasmatozyten als auch von Granulären Zellen der *M. sexta*-Larven phagozytiert. Dabei traten nach einer Injektion von *B. megaterium* zunächst Assoziationen der Bakterien mit Plasmatozyten auf, was zur Aggregatbildung führte. An solchen Aggregaten sind überwiegend Plasmatozyten, aber auch Granuläre Zellen beteiligt. Plasmatozyten sind in solchen Fällen kaum noch frei zirkulierend zu finden. Im weiteren Verlauf erhöht sich die Zahl der freien Plasmatozyten wieder. Auf dem Fettkörper sind die Bakterien direkt nach einer Injektion frei verteilt. Mit der Zeit treten sie jedoch in Clustern auf, was möglicherweise mit agglutinierenden Faktoren in Zusammenhang steht.

Durch Affinitätspräzipitation wurden erste Hinweise erlangt, dass in der zellfreien Hämolymphe von *M. sexta*-Larven ein Bindungsprotein für Gram-positive Bakterien mit einem relativen Molekulargewicht von 15-20 k vorhanden ist. Dies wurde durch die Arbeitsgruppe um M. Kanost (Manhattan, KS, USA) mit der Isolierung zweier cDNA-Klone aus einer *M. sexta*-cDNA-Fettkörperbank bestätigt, deren Sequenzen für *peptidoglycan recognition proteins* kodieren.

Mittels des Screenings einer induzierten cDNA-Hämozyten- und einer induzierten cDNA-Fettkörper-Expressionsbank von *M. sexta* mit monoklonalen Antikörpern gegen Hämozyten von *M. sexta* wurden sechs Klone detektiert, die für Sequenzen eines neuen *M. sexta*-Annexins kodieren. Es wurde Annexin-IX bzw. Annexin B9 genannt. Der verwendete Antikörper MS#78 wird als anti-Annexin IX-Antikörper definiert. Es stellte sich heraus, dass das *M. sexta*-Annexin IX eine große

Ähnlichkeit auch bezüglich der Struktur des Gens mit dem bereits bekannten Annexin IX von *B. mori* aufweist, d. h. man kann von einer Homologie ausgehen. Es liegt ebenfalls mit drei Isoformen A, B und C vor, die sich in einem kurzen 16 Aminosäure langen C-terminalen Stück unterscheiden. Die Sequenzen zweier Klone kodieren für Annexin IX-C, die von einem, evtl. von zweien, kodieren für Annexin IX-B und zwei Sequenzen vermutlich für Annexin IX-A. Einer der letztgenannten beiden Klone war *kein full length* Klon, es fehlte das N-terminale Ende. Er wies aber die cDNA-Sequenz einer prä-mRNA mit einem Intron auf. Die drei Annexin IX-Isoformen entstehen vermutlich aus einem einzigen Gen durch alternatives Spleißen der C-terminalen Region, wobei der Mechanismus des Spleißens alternativer 3'-Spleißstellen vorliegt.

Über die Funktion des Annexin IX ist nichts bekannt. Es konnte in Hämocyten und im Fettkörper immunhistologisch nachgewiesen werden, nicht jedoch in der Hämolymphe. Ob es am Immungeschehen beteiligt ist, kann nur vermutet werden. Da die Klone aus induzierten cDNA-Banken stammen, kann zumindest festgehalten werden, dass es in bakteriell infizierten Larven transkribiert und nicht reprimiert wird. Das relative Molekulargewicht liegt bei ca. 33-34 k. Ein Signalpeptid ist nicht vorhanden. Es konnten verschiedene Domänen in der Sequenz detektiert werden wie N-Glykosylierungs-, Myristylierungs- und verschiedene Phosphorylierungsstellen, die für Annexine typischen Annexin-Domänen und eine Calciumbindungstelle sowie ein KGD-Motiv.

Im Rahmen eines EST-Projekts der Hämocyten-cDNA-Bank aus *M. sexta* konnten verschiedene Sequenzen ermittelt werden, die Proteine kodieren, die am Immungeschehen und an der Individualentwicklung beteiligt sind. Sie kodieren auch Strukturproteine, Enzyme und Proteine, die an Nukleinsäuren binden. Zu einigen der hier identifizierten EST-Sequenzen konnten keine vergleichbaren Sequenzen bzw. nur solche mit geringer Übereinstimmungswahrscheinlichkeit in Datenbanken gefunden werden, so dass hier das Potential für Sequenzen neuer noch nicht entdeckter Proteine bei *M. sexta* liegt.

## 6 Literaturverzeichnis

- AGAISSE H. & PERRIMON N. (2004) The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 198, 72-82
- AGAISSE H., PETERSEN U. M., BOUTROS M., MATHEY-PREVOT B. & PERRIMON N. (2003) Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5, 441-450
- ANDERL I. (2001) Untersuchungen zur Phagozytose von *Manduca sexta* L., Sphingidae. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- ANDERSON K. V., BOKLA L. & NÜSSLEIN-VOLLHARD C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798
- ANDERSSON K. & STEINER H. (1987) Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem* 17(1), 133-140
- ARAKI Y., NAKATANI T., NAKAYAMA K. & ITO E. (1972) Occurrence of N-nonsubstituted glucosamine residues in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell walls from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem*, 247(19), 6912-6322
- ARUR S., UCHE U. E., REZAUL K., FONG M., SCRANTON V., COWAN A. E., MOHLER W. & HAN D. K. (2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4, 587-598
- ASHHURST D. E. (1982) Histochemical properties of the spherulocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Morphol Embryol* 11, 285-292
- ASHIDA M. & YAMAZAKI H. I. (1990) The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res Immunol* 141, 908-910
- AU C., DEAN P., REYNOLDS S. E. & FRENCH-CONSTANT R. H. (2004) Effect of the insect pathogenic bacterium *Photobacterium* on insect phagocytes. *Cell Microbiol* 6(1), 89-95
- AXÉN A., CARLSSON A., ENGSTRÖM Å., BENNIC H. (1997) Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Eur J Biochem* 247, 614-619
- BANCES P., FERNANDEZ M.-R., RODRIGUEZ-GARCIA M.-I., MORGAN R. O. & FERNANDEZ M.-P. (2000) Annexin A11 (ANXA11) gene structure as the progenitor of paralogous annexins and source of orthologous cDNA isoforms. *Genomics* 69, 95-103
- BARILLAS-MURY C., HAN Y. S., SEELEY D., KAFATOS F. C. (1999) *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J* 18, 959-967



- BARNES J. A. & GOMES A. V. (2002) Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol Cell Biochem* 231, 1-7
- BARTHOLOMAY L. C., FUCHS J. F., CHENG L.-L., BECK E. T., VIZIOLI J., LOWENBERGER C. & CHRISTENSEN B. M. (2004) Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 13(2), 125-132
- BARTON G. J., NEWMAN R. H., FREEMONT P. S. & CRUMPTON M. J. (1991) Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur J Biochem* 198, 749-760
- BASTIAN B. C. (1997) Annexins in cancer and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 53, 554-556
- BATEMAN A., BIRNEY E., CERRUTI L., DURBIN R., ETWILLER L., EDDY S. R., GRIFFITHS-JONES S., HOWE K. L., MARSHALL M. & SONNHAMMER E. L. L. (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res* 30(1), 276-280
- BEALL B & LUTKENHAUS J (1987) Sequence analysis, transcriptional organization, and insertional mutagenesis of the *envA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169(12), 5408-5415
- BECKAGE N. E. & KANOST M. R. (1993) Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 23(5), 643-653
- BEETZ S. (2002) Vergleichende Untersuchungen zum Hämozytenbild von Larve und Puppe des Tabakswärmers *Manduca sexta* L.. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen. URN: urn:ubn:de:hebis:26-opus-7749, URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/774>
- BELL R. A. & JOACHIM F. G. (1976) Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco hornworms and pink bollworms. *Ann Ent Soc Am* 69(2), 365-373
- BENDTSEN J. D., NIELSEN H., VON HEIJNE G. & BRUNAK S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795
- BENEVOLENSKAYA E. V., NURMINSKY D. I. & GVOZDEV V. A. (1995) Structure of the *D. melanogaster* Annexin X gene. *DNA Cell Biol* 14(4), 349-357
- BENSON D. A., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D. J., OSTELL J., RAPP B. A. & WHEELER D. L. (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res* 30(1), 17-20
- BETTENCOURT R., ASSEFAW-REDDA Y. & FAYE I. (2000) The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis. *Mech Dev* 95, 301-304

- BJELLQVIST B., HUGHES G. J., PASQUALI C., PAQUET N., RAVIER F., SANCHEZ J.-C., FRUTIGER S. & HOCHSTRASSER D. F. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14, 1023-1031
- BJELLQVIST B., BASSE B., OLSEN E. & CELIS J. E. (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15, 529-539
- BLACK D. L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336
- BLAKE M. S., JOHNSTON K. H., RUSSELL-JONES G. J. & GOSCHLICH E. C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of Alkaline Phosphatase-conjugated anti-antibody on Western Blots. *Anal Biochem* 136, 175-179
- BLITVICH B. J., RAYMS-KELLER A., BLAIR C. D. & BEATY B. J. (2001) Complete cDNA and deduced amino acid sequence of the chaperonin containing T-complex polypeptide 1 (CCT) delta subunit from *Aedes triseriatus* mosquitoes. *DNA Seq* 12(3), 203-208
- BLUM H., BEIER H. & GROSS H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
- BOMAN H. G. , NILSSON-FAYE I., PAUL K. & RASMUSON T. J. (1974) Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Insect Biochem Mol Biol* 26, 403-409
- BOMAN H. G. (1996) Peptide Antibiotics: Holy or heretic grails of innate immunity? *Scand J Immunol* 43, 475-482
- BREY P. T., LEE W.-J., YAMAKAWA M., KOIZUMI Y., PERROT S., FRANÇOIS M. & ASHIDA M. (1993) Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6275-6279
- BROCK T. D., MADIGAN M. T., MARTINKO J. M. & PARKER J. (1994) *Biology of Microorganisms*. 7<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall International, London, GB
- BROHMER P. (1988) *Fauna von Deutschland*. 17. überarb. Auflage, Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden
- BULET P., HETRU C., DIMARCQ J.-L. & HOFFMANN D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23, 329-344
- BULET P., STÖCKLIN R. & MENIN L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198, 169-184

- CAOHUY H. & POLLARD H. B. (2002) Protein kinase C und guanosine triphosphate combine to potentiate Calcium-dependent membrane fusion driven by annexin 7. *J Biol Chem* 277(28), 25217-25225
- CARLSSON A., NYSTRÖM T., DE COCK H., BENNICHI H. (1998) Attacin – an insect immune protein – binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer membrane protein synthesis. *Microbiology* 144, 2179-2188
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, 116-126
- CHARALAMBIDIS N. D., ZERVAS C. G., LAMBROPOULOU M., KATSORIS P. G. & MARMARAS V. J. (1995) Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation. *Eur J Cell Biol* 67, 32-41
- CHAUDHURI M. M., TONIN P. N. & SRINIVASAN P. R. (1992) cDNA sequence of the small subunit of the hamster ribonucleotide reductase. *Biochim Biophys Acta* 1171(1), 117-121
- CHRISTOPHIDES, G. K., ZDOBNOV E., BARILLAS-MURY C., BIRNEY E., BLANDIN, S., BLASS C., BREY P. T., COLLINS F. H., DANIELLI A., DIMOPOULOS G., HETRU C., HOA N. T., HOFFMANN J. A., KANZOK S. M., LETUNIC I., LEVASHINA E. A., LOUKERIS T. G., LYCETT G., MEISTER S., MICHEL K., MOITA L. F., MULLER H.-M., OSTA M. A., PASKEWITZ S. M., REICHHART, J.-M., RZHETSKY A., TROXLER L., VERNICK K. D., VLACHOU D., VOLZ J., VON MERING C., XU J., ZHENG L., BORK P. & KAFATOS F. C. (2002) Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-165
- COOLEY L., VERHEYEN E. & AYERS K. (1992) *Chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69(1), 173-184
- COOPER T. A. & MATTOX W. (1997) The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet* 61, 259-266
- CREUTZ C. E., SNYDER S. L., DAIGLE S. N. & REDICK J. (1996) Identification, localization, and functional implications of an abundant nematode annexin. *J Cell Biol* 132, 1079-1092
- CROSSLEY A. C. (1981) Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage and secretion in hemocytes. In: *Insect hemocytes: development, forms, function and techniques*. Ed. A. P. Gupta, Cambridge University Press, London, UK, pp. 423-473
- DE GREGORIO E., SPELLMAN P. T., RUBIN G. M. & LEMAITRE B. (2001) Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *PNAS* 98(22), 12590-12595
- DELMER D. P. & POTIKHA T. S. (1997) Structures and functions of annexins in plants. *Cell Mol Life Sci* 53, 546-553

- DEUTSCHER M. P. (ed.) (1990) Guide to protein purification. Methods in enzymology, Volume 182, Academic Press, San Diego, CA, USA
- DICKINSON L., RUSSELL V. & DUNN P. E. (1988) A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. J Biol Chem 263(36), 19424-19429
- DUNN P. E. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. Ann Rev Entomol 31, 321-339
- DUNN P. E., BOHNERT T. Y. & RUSSELL V. (1994) Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*. In: Primordial immunity foundations for the vertebrate immune system. Eds. G. Beck, G. S. Habicht, E. L. Cooper & J. J. Marchalonis, Annales of the New York Academy of Sciences 712, 117-130
- DUNN P. E. & DAI W. (1990) Bacterial peptidoglycan: a signal for initiation of the bacteria-regulated synthesis and secretion of lysozyme in *M. sexta*. In: Defense molecules. Eds. J. J. Marchalonis & C. L. Reinisch, Alan R. Liss, New York, USA, pp. 33-46
- DUNN P. E., DAI W., KANOST M. R. & GENG C. (1985) Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. Dev Comp Immunol 9, 559-568
- DUNN P. E. & DRAKE D. R. (1983) Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. J Invertebr Pathol 41, 77-85
- DUNN P. E., KANOST M. R. & DRAKE D. R. (1987) Increase in serum lysozyme following injection of bacteria into larvae of *Manduca sexta*. In: Molecular entomology. Ed. J. H. Law, Alan R. Liss, New York, USA, pp. 381-390
- DUNPHY G. & HALWANI A. (1997) Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). J Insect Physiol 43, 1023-1029
- DZIARSKI R. (2000) Bacterial peptidoglycan binds to tubulin. Biochim Biophys Acta 1524, 17-26
- DZIARSKI R., ULMER A. J. & GUPTA D. (2000) Interactions of CD14 with components of Gram-positive bacteria. Chem Immunol 74, 83-107
- DZIARSKI R. (2003) Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. Cell Mol Life Sci 60, 1793-1804
- DZIARSKI R. (2004) Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Mol Immunol 40, 877-886

- ENGSTRÖM P., CARLSSON A., ENGSTRÖM Å., TAO Z. J. & BENNICHT H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the giant silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. The EMBO Journal 3, 3347-3351
- ENGSTRÖM Y. (1999) Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. Dev Comp Immunol 23, 345-358
- FALQUET L., PAGNI M., BUCHER P., HULO N., SIGRIST C. J., HOFMANN K. & BAIROCH A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. Nucleic Acids Res 30(1), 235-238.
- FAURE A.-V., MIGNÉ C., DEVILLIERS G. & AYALA-SANMARTIN J. (2002) Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. Exp Cell Res 276, 79-89
- FAYE I. & WYATT G. R. (1980) The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae. Experientia 36, 1325-1326
- FEHLBAUM P., BULET P., MICHAUT L., LAGUEUX M., BROEKAERT W. F., HETRU C. & HOFFMANN J. A. (1994) Insect immunity. J Biol Chem 269(52), 33159-33163
- FEY M. F., MOFFAT G. J., VIK D. P., MEISENHOLDER J., SARIS C. J. M., HUNTER T. & TACK B. F. (1996) Complete structure of murine p36 (annexin II) gene. Identification of mRNAs for both the murine and the human gene with alternatively spliced 5' noncoding exons. Biochim Biophys Acta 1306, 160-170
- FIEDLER K., LAFONT F., PARTON R. G. & SIMONS K. (1995) Annexin XIIIb : a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. J Cell Biol 128, 1043-1053
- FINNERTY, C. M., KARPLUS P. A. & GRANADOS R. R. (1999) The insect immune protein scolexin is a novel serine protease homolog. Protein Sci 8, 242-248
- FOTIADOU N.-K. (1994) Untersuchungen zur Induktion der zellulären und humoralen Immunantwort durch Lipopolysaccharid (LPS) bei der Larve der Großen Wachsmotte, *Galleria mellonella* (L.). Diplomarbeit, Freie Universität, Berlin
- FRASER I. P., KOZIEL H. & EZEKOWITZ R. A. B. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin Immunol 10, 363-372
- FUJIMOTO Y., KOBAYASHI A., KURATA S. & NATORI S. (1999) Two subunits of the insect 26/29-kDa proteinase are probably derived from a common precursor protein. J Biochem 125(3), 566-573

- GAN H., WANG Y., JIANG H., MITA K. & KANOST M. R. (2001) A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 887-898
- GASTEIGER E., GATTIKER A., HOOGLAND C., IVANYI I., APPEL R. D. & BAIRDOCH A. (2003) ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788
- GEISOW M. J. (1991) Annexins – forms without function – but not without fun. *TIBTECH* 9, 180-181
- GELIUS E. (2003) A family of peptidoglycan recognition proteins in innate immunity. Doctoral thesis, Stockholm University, Stockholm, S
- GENG C. & DUNN P. E. (1989) Plasmatocyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. *Dev Comp Immunol* 13, 17-23
- GERKE V. & MOSS S. E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357, 129-154
- GERKE V. & MOSS S. E. (2002) Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 82, 331-371
- GIULIANINI P. G., BERTOLO F., BATTISTELLA S. & AMIRANTE G. A. (2003) Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in *in vivo* phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 243-251
- GILLESPIE J. P., KANOST M. & TRENCZEK T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 42, 611-643
- GOEBELER V., RUHE D., GERKE V. & RESCHER U. (2003) Atypical properties displayed by annexin A9, a novel member of the annexin family of  $\text{Ca}^{2+}$  and lipid binding proteins. *FEBS Letters* 546, 359-364
- GOTTAR M., GOBERT V., MICHEL T., BELVIN M., DUYK G., HOFFMANN J. A., FERRANDON D. & ROYET J. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416, 640-644
- GOTO A., KUMAGAI C., HIROSE J., NARITA H., MORI H., KADOWAKI T., BECK K. & KITAGAWA Y. (2001) A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolactin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem J* 359, 99-108
- GRAVELEY B. R. (2001) Alternative. Splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genet* 17(2), 100-107
- GRIGAT J. (2003). Untersuchungen zur Signaltransduktion bei Phagocytosevorgängen an Hämocyten von *M. sexta*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen

- GUPTA D., WANG Q., VINSON C & DZIARSKI R. (1999) Bacterial peptidoglycan induces CD14-dependent activation of transcription factors CREB/ATF and AP-1. *J Biol Chem* 274(20), 14012-14020
- HALL M., SCOTT T., SUGUMARAN M., SÖDERHÄLL K. & LAW J. H. (1995) Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7764-7768
- HARLOW E. & LANE D. (1988) Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- HAYES M. J. & MOSS S. E. (2004) Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1166-70
- HED J. (1986) Methods for distinguishing ingested from adhering particles. *Meth Enzymol* 132, 198-204
- HEGEMER C. (2003) Untersuchungen an Hämocyten und Hämolymphe von *Manduca sexta* mittels verschiedener elektrophoretischer Methoden. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- HENIKOFF S. & EGHTEGARZADEH M. E. (1987) Conserved arrangement of nested genes at the *Drosophila gart* locus. *Genetics* 117, 711-725
- HOFFMANN D., HULTMARK D. & BOMAN H. G. (1981) Insect immunity: *Galleria mellonella* and other lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against Gram negative bacteria. *Insect Biochem* 11, 537-548
- HOFFMANN J. A. (1995) Innate immunity of insects. *Curr Op Immunol* 7, 4-10
- HOFFMANN J. A. & KAFATOS F. C., JANEWAY JR. C. A. & EZEKOWITZ R. A. B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318
- HORODYSKI F. M., RIDDIFORD L. M. & TRUMAN J. W. (1989) Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8123-8127
- HOROHOV D. W. & DUNN P. E. (1982) Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J Invertebr Pathol* 40, 327-339
- HOROHOV D. W. & DUNN P. E. (1983) Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Invertebr Pathol* 41, 203-213
- HOVEMANN B., RICHTER S. WALLDORF U. & CZIEPLUCH C. (1988) Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) in *Drosophila melanogaster* with continuous specific expression. *Nucleic Acids Research* 16(8), 3175-3194

- HUGHES J. A., HURLBERT R. E., RUPP R. A. & SPENCE K. D. (1983) Bacteria-induced haemolymph proteins of *Manduca sexta* pupae and larvae. *J Insect Physiol* 29(8), 625-632
- HULTMARK D., ENGSTRÖM Å., ANDERSSON K., STEINER H., BENNICH, H. & BOMAN H. G. (1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO Journal* 2(4), 571-576
- HULTMARK D. (1996) Insect lysozymes. In: *Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology*. Ed. P. Jollès, Birkhäuser Verlag, Basel, CH, pp. 87-102
- HULTMARK D. (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15, 12-19
- HURLBERT R. E., KARLINSEY J. E. & SPENCE K. D. (1985) Differential synthesis of bacteria-induced proteins of *Manduca sexta* larvae and pupae. *J Insect Physiol* 31(3), 205-215
- IGLESIAS J.-M., MORGAN R. O., JENKINS N. A., COPELAND N. G., GILBERT D. J. & FERNÁNDEZ M.-P. (2002) Comparative genetics and evolution of annexin A13 as the founder gene of vertebrate annexins. *Mol Biol Evol* 19(5), 608-618
- IKETANI M. & MORISHIMA I. (1993) Induction of antibacterial protein synthesis by soluble peptidoglycan in isolated fat body from larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 23(8), 913-917
- IKETANI M., NISHIMURA H., AKAYAMA K., YAMANO Y. & MORISHIMA I. (1999) Minimum structure of peptidoglycan required for induction of antibacterial protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 19-24
- IMAMURA M. & YAMAKAWA M. (2002) Molecular cloning and expression of Toll receptor gene homologue from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta* 1576, 246-254
- INAMORI K., ARIKI S. & KAWABATA S. (2004) A Toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol Rev* 198, 106-115
- IWAMA R. & ASHIDA M. (1986) Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem* 16, 547-555
- JIANG H., WANG Y., HUANG Y., MULNIX A. B., KADEL J., COLE K. & KANOST M. R. (1996) Organization of serpin gene-1 from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 271(45), 28017-28023
- JIANG H., WANG Y., MA C. & KANOST M. R. (1997) Subunit composition of prophenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. *Insect Biochem Mol Biol* 27, 835-850



- JIANG H., WANG Y., KANOST M. R. (1998) Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. Proc Natl Acad Sci USA 95, 12220-12225
- JIANG H., WANG Y., KANOST M. R. (2001) Proteolytic activation of prophenoloxidase in an insect *Manduca sexta*. Adv Exp Med Biol 484, 313-317
- JIANG H., WANG Y., YU X.-Q. & KANOST M. R. (2003a) Prophenoloxidase-activating proteinase-2 (PAP-2) from hemolymph of *Manduca sexta*: a bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. J Biol Chem 278, 3552-3561
- JIANG H., WANG Y., YU X.-Q., ZHU Y. & KANOST M. R. (2003b) Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. Insect Biochem Mol Biol 33, 1049-1060
- JIANG H., MA C., LU Z.-Q. & KANOST M. (2004)  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein-2 ( $\beta$ GRP-2) from *Manduca sexta*: acute-phase protein that binds  $\beta$ -1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. Insect Biochem Mol Biol 34, 89-100
- JOHANSSON M. W. (1999) Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev Comp Immunol 23, 303-315
- JOHNSON J. M., CASTLE J., GARRETT-ENGELE P., KAN Z., LOERCH P. M., ARMOUR C. D., SANTOS R., SCHADT E. E., STOUGHTON R. & SHOEMAKER D. D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. Science 302, 2141-2144
- JOHNSTON P. A., PERIN M. S., REYNOLDS G. A. WASSERMAN S. A. & SÜDHOF T. C. (1990) Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem 265(19), 11382-11388
- JOMORI T., KUBO T. & NATORI S. (1990) Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of american cockroach, *Periplaneta americana*. Eur J Biochem 190, 201-206
- JOMORI T. & NATORI S. (1991) Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the american cockroach, *Periplaneta americana*. J Biol Chem 266(20), 13318-13323
- JONES D. T., TAYLOR W. R. & THORNTON J. M. (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. Biochem. 33, 3038-3049
- JONES D. T. (1998) Do transmembrane protein superfolds exist? FEBS Letters 423, 281-285
- JONES D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based position-specific scoring matrices. J Mol Biol 292, 195-202

- KAETZEL M. A., MO Y. D., MEALY T. R., CAMPOS B., BERGSMA-SCHUTTER W., BRISSON A., DEDMAN J. R. & SEATON B. A. (2001) Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* 40, 4192-4199
- KAMIE K., TAIRA H., OOURA H., KAKUTA A., MATSUMOTO S., EJIRI S.-I. & KATSUMATA T. (1993) Nucleotide sequence of the cDNA encoding silk gland elongation factor 1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Res* 21(3), 742
- KANG D., ROMANS P. & LEE J.-Y. (1996) Analysis of lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene* 174, 239-244
- KANG D., LIU G., LUNDSTRÖM A., GELIUS E. & STEINER H. (1998) A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95(17), 10078-10082
- KANOST M. R., DAI W. & DUNN P. E. (1988) Peptidoglycan fragments elicit antibacterial proteinsynthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 8, 147-164
- KANOST M. R., KAWOoya J. K., LAW J. H., RYAN R. O., VAN HEUSDEN M. C. & ZIEGLER R. (1990) Insect haemolymph proteins. *Adv Insect Physiol* 22, 299-396
- KANOST M. R., JIANG H. & YU X.-Q. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 198, 97-105
- KAPPELER S. R., FARAH Z. & PUHAN Z. (2003) 5'-flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *J Dairy Sci* 86, 498-508
- KAWASAKI H., SUGAYA K., QUAN G.-X., NOHATA J. & MITA K. (2003) Analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin genes of *Bombyx mori* using an EST database. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 131-137
- KAWASAKI K., KUBO T. & NATORI S. (1996) Presence of the periplaneta lectin-related protein family in the american cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Molec Biol* 26(4), 355-364
- KELLEY L. A., MACCALLUM R. M. & STERNBERG M. J. E. (2000) Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J Mol Biol* 299(2), 499-520
- KIM Y.-S., RYU J.-H., HAN S.-J., CHOI K.-H., NAM K.-B., JANG I.-H., LEMAITRE B., BREY P. T. & LEE W.-J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immunity genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 275, 32721-32727
- KIMBRELL D. A. & BEUTLER B. (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2, 256-267

- KITO K., YEH E. T. H. & KAMITANI T. (2001) NUB1, a NEDD8-interacting protein, is induced by interferon and down-regulates the NEDD8 expression. *J Biol Chem* 276(23), 20603-20609
- KITZROW D., BLOBEL H. & SCHAEF W. (1975) Isolierung von Kapselsubstanzen von *Staphylococcus aureus*. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt. Orig. A* 223, 305-313
- KLÜNNER T. (1994) Isolierung und Darstellung von Lipopolysaccharid-Bindungsfaktoren aus der Hämolymphe von *Galleria mellonella* L. Diplomarbeit, Freie Universität, Berlin
- KOIZUMI N., MOROZUMI A., IMAMURA M., TANAKA E., IWAHANA H. & SATO R. (1997) Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Biochem* 248, 217-224
- KOTANI E., YAMAKAWA M., IWAMOTO S., TASHIRO M., MORI H., SUMIDA M., MATSUBARA F., TANAI K., KADONO-OKUDA K., KATO Y. & MORI H. (1995) Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochim Biophys Acta* 1260, 245-258
- KOURIE J. I. & WOOD H. B. (2000) Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys & Mol Biol* 73, 91-134
- KUNO H. & KIHARA H. K. (1967) Simple microassay of protein with membrane filter. *Nature* 215, 974-975
- KURUCZ E., ZETTERVALL C.-J., SINKA R., VILMOS P., PIVARCSI A., EKENGREN S., HEGEDÜS Z., ANDO I. & HULTMARK D. (2003) *Hemese*, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *PNAS* 100(5), 2622-2627
- KYHSE-ANDERSEN J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 3, 97-128
- KYRIAKIDES T. R., MCKILLIP J. & SPENCE K. D. (1995) Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 29, 269-280
- KYTE J & DOOLITTLE R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132
- LACKIE, A. M. (1988) Haemocyte behaviour. *Adv Insect Physiol* 21, 85-178
- LADENDORFF N. E. & KANOST M. R. (1990) Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 15, 33-41

- LADENDORFF N. E. & KANOST M. R. (1991) Bacteria-induced protein P4 (Hemolin) from *Manduca sexta*: A member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch Insect Biochem Physiol* 18, 285-300
- LAEMMLI U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LAFONT F., LECAT S., VERKANDE P. & SIMONS K. (1998) Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* 142, 1413-1427
- LAI-FOOK J. (1966) The repair of wounds in the integument of insects. *J Insect Physiol* 12, 195-226
- LECLERC V. & REICHHART J.-M. (2004) The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 198, 59-71
- LEE W.-J., LEE J.-D., KRAVCHENKO V. V., ULEVITCH R. J. & BREY P. T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7888-7893
- LEMAITRE B. (2004) The road to Toll. *Nat Rev Immunol* 4, 521-527
- LI J., WANG Z., CANAGARAJAH B., JIANG H., KANOST M. R. & GOLDSMITH E. J. (1999) The structure of active serpin K from *Manduca sexta* and a model for serpin-protease complex formation. *Structure* 7, 103-109
- LIEMANN S. & HUBER R. (1997) Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 53, 516-521
- LIU C., GELIUS E., LIU G., STEINER H. & DZIARSKI R. (2000) Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *J Biol Chem* 275(32), 24490-24499
- LIU C., XU Z., GUPTA D. & DZIARSKI R. (2001) Peptidoglycan recognition proteins – A novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 276(37), 34686-34694
- LOKER E. S., ADEMA C. M., ZHANG S.-M. & KEPLER T. B. (2004) Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev* 198, 10-24
- LODISH H., BERK A., ZIPURSKY S. L., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D. & DARNELL J. E. (2001) *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- LUNDSTRÖM A., LIU G., KANG D., BERZINS K. & STEINER H. (2002) *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial protein. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 795-801

- MA C. & KANOST M. R. (2000) A  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the prophenoloxidase cascade. J Biol Chem 275, 7505-7514
- MACKINTOSH J. A. GOOLEY A. A., KAUSO P. H., BEATTIE A. J., JARDINE D. R., VEAL D. A. (1998) A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial protein challenge. Dev Comp Immunol 22, 387-399
- MAILLIARD W. S., HAIGLER H. T. & SCHLAEPFER D. D. (1996) Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of Annexin I. J Biol Chem 271(2), 719-725
- MANGÉ A., COUBLE P. & PRUDHOMME J.-C. (1996) Two alternative promoters drive the expression of the cytoplasmic actin A4 gene of *Bombyx mori*. Gene 183, 191-199
- MARCU O. & LOCKE M. (1998) A cuticular protein from the moulting stages of an insect. Insect Biochem Mol Biol 28, 659-669
- MARMARAS V. J. & CHARALAMBIDIS N. D. (1992) Certain hemocyte proteins in the medfly, *Ceratitis capitata*, are responsible for nonself recognition and immobilization of *Escherichia coli* in vitro. Arch Insect Biochem Physiol 21, 281-288
- MATHA V. & GRUBHOFFER L., WEYDA F. & HERANOVÁ L. (1990) Detection of  $\beta$ -1,3-glucan-specific lectin on the surface of plasmatocytes, immunocompetent cells of the great wax moth, *Galleria mellonella* L.. Cytobios 64, 35-42
- MATSUNAGA T. M. & FUJIWARA H. (2002) Identification and characterization of genes abnormally expressed in wing-deficient mutant (*flügellos*) of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 32, 691-699
- MATTINGLY K. S., BEATY B. J., MACKIE R. S., MCGAW M., CARLSON J. Q. & RAYMS-KELLER A. (2001) Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Chironomus tentans* alpha-tubulin cDNA. Aquat Toxicol 54(3-4), 249-260
- MAYRAN N., PARTON R. G. & GRUENBERG J. (2003) Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. EMBO J 22(13), 3242-3253
- MCGUFFIN L. J., BRYSON K. & JONES D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16(4), 404-405
- MELLROTH P., KARLSSON J. & STEINER H. (2003) A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. J Biol Chem 278(9), 7059-7064

- MERZENDORFER H, REINEKE S., ZHAO X.-F., JACOBMEIER B., HARVEY W. R. & WIECZOREK H. (2000) The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1467, 369-379
- MINNICK M. F., RUPP R. A. & SPENCE K. D. (1986) A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in *Manduca sexta*. *Biochem Biophys Res Commun* 137, 729-735
- MOHRIG W. & MESSNER B. (1968) Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrsystem der Insekten. *Biol Zbl* 87, 439-470
- MONNER D. A., JONSSON S. & BOMAN H. G. (1971) Ampicillin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12 with lipopolysaccharide alterations affecting mating ability and susceptibility to sex-specific bacteriophages. *J Bacteriol* 107(2), 420-432
- MONTAVILLE P., NEUMANN J.-M., RUSSO-MARIE F., OCHSENBEIN F. & SANSON A. (2002) A new consensus sequence for phosphatidylserine recognition by annexins. *J Biol Chem* 277(27), 24684-24693
- MORGAN R. O. & FERNÁNDEZ M. P. (1997) Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 53, 508-515
- MORGAN R. O. & FERNÁNDEZ M. P. (1998) Expression profile and structural divergence of novel human annexin 31. *FEBS Lettes* 434, 300-304
- MORGAN R. O., JENKINS N. A., GILBERT D. J., COPELAND N. G., BALSARA B. R., TESTA J. R. & FERNANDEZ M. P. (1999) Novel human and mouse Annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 60, 40-49
- MORISHIMA I., YAMADA K. & UENO T. (1992) Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 22(4), 363-367
- MORLAIS I., MORI A., SCHNEIDER J. R. & SEVERSON D. W. (2003) A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Mol Gen Genomics* 269, 753-764
- MOSS S. E. & MORGAN R. O. (2004) The annexins. *Genome Biol* 5(4), 219.1-219.8 (*electronic version*) URL: <http://genomebiology.com/2004/5/4/219>
- MOUNT S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10(2), 459-472
- MÜLHARDT C. (2002) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- MULNIX A. B. & DUNN P. E. (1994) Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 24, 271-81
- MUZIO M. & MANTOVANI A. (2000) Toll-like receptors. *Microbes and Infection* 2, 251-255
- NAPPI A. J. & VASS E. (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res* 6, 117-126
- NARDI J. B., MARTOS R., WALDEN K. K. O., LAMPE D. J. & ROBERTSON H. M. (1999) Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 883-897
- NARDI J. B., GAO C., KANOST M. R. (2001) The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. *J Insect Physiol* 47, 997-1006
- NICHOLAS K. B., NICHOLAS H. B. JR. & DEERFIELD D. W. II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14
- NIELSEN H., ENGELBRECHT J., BRUNAK S & VON HEIJNE G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6
- NORMARK S., BOMAN H. G. & MATSSON E. (1969) Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *J Bacteriol* 97, 1334-1342
- OCHIAI M. & ASHIDA M. (1999) A pattern recognition protein for peptidoglycan – cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 274(17), 11854-11858
- OCHIAI M. & ASHIDA M. (2000) A pattern-recognition protein for  $\beta$ -1,3-glucan: the binding domain and the cDNA cloning of  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 275, 4995-5002
- OCHIAI M., NIKI T. & ASHIDA M. (1992) Immunocytochemical localization of  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein in silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res* 268, 431-437
- OZEKI M., HOSHINO S., HIAI H. & TOYOKUNI S. (2002) Isolation and characterization of *annexin 2* pseudogene on *Rattus norvegicus*. *Gene* 289, 185-190
- PAGNI M., IOANNIDIS V., CERUTTI L., ZAHN-ZABAL M., JONGENEEL C. V. & FALQUET L. (2004) MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res* 32, Web Server issue

- PARENTE L. & SOLITO E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res.* 53, 125-132
- PARK J. W., PARISKY K., CELOTTO A. M., REENAN R. A. & GRAVELEY B. R. (2004) Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *PNAS* 101(45), 15974-15979
- PECH L. L. & STRAND M. R. (1996) Granular cells are required of encapsulation for foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* 109, 2053–2060
- PECH L. L. & STRAND M. R. (2000) Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J Insect Physiol* 46, 1565-1573
- PERRETTI M. (1998) Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol* 31, 545-552
- PILI-FLOURY S., LEULIER F., TAKAHASHI K., SAIGO K., SAMAIN E., UEDA R. & LEMAITRE B. (2004) *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem* 279(13), 12848-12853
- PONS M., GREWAL T., RIUS E., SCHNITGERHANS T., JÄCKLE S. & ENRICH C. (2001) Evidence for the involvement of Annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 269, 13-22
- PREIK-STEINHOFF H., EUE I. & TRENCZEK T. (1992) Einsatz von FITC-markiertem LPS zur Funktionsanalyse der Hämocyten von *Galleria mellonella* und *Hyalophora cecropia*. *Verh d Dtsch Zool Ges* 85, 213
- QIAGEN (1998) The QIAGEN guide to template purification and DNA sequencing. 2<sup>nd</sup> edition. Qiagen GmbH, Hilden
- RÄMET M., MANFRUELLI, P. PEARSON A., MATHEY-PREVOT B. & EZEKOWITZ R. A. B. (2002) Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416, 644-648
- RASMUSON T. & BOMAN H. G. (1979) Insect immunity – V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Insect Biochem* 9, 259-264
- RATCLIFFE N. A. & GAGEN S. J. (1976) Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J Invertebr Pathol* 28, 373-382
- RATCLIFFE N. A. & ROWLEY A. F. (1974) *In vitro* phagocytosis of bacteria by insect blood cells. *Nature* 252, 391-392



- RATCLIFFE N. A. & ROWLEY A. F. (1979) Role of hemocytes in defense against biological agents. In: Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques. Ed. A. P. Gupta, Cambridge University Press, London, UK, pp. 331-414
- RATCLIFFE N. A. (1986) Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. In: Immune mechanisms in invertebrate vectors. Ed. A. M. Lackie Zool Society of London, Symposia 56, 21-43
- RAYNAL P. & POLLARD H. B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197, 63-93
- REGIER J. C., MITTER C., FRIEDLANDER T. P. & PEIGLER R. S. (2001) Letters to the Editor. Re: Phylogenetic relationships in Sphingidae (Insecta: Lepidoptera): Initial evidence from two nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 20(2), 311-325
- REHMAN A., TAISHI P., FANG J., MAJDE J. A. & KRUEGER J. M. (2001) The cloning of a rat peptidoglycan recognition protein (PGRP) and its induction in brain by sleep deprivation. *Cytokine* 13(1), 8-17
- RESH M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451, 1-16
- REUTELINGSPERGER C. P. M. & VAN HEERDE W. L. (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 53, 527-532
- REYNOLDS E. S. (1963) The use of leadcitrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-217
- RIETSCHEL E. T., SCHLETTER J., WEIDEMANN B., EL-SAMALOUTI V., MATTERN T., ZÄHRINGER U., SEYDEL U., BRADE H., FLAD H.-D., KUSUMOTO S., GUPTA D., DZIARSKI R. & ULMER A. J. (1998) Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microbial Drug Resistance* 4(1), 37-44
- ROHLOFF L. H., WIESNER A. & GÖTZ P. (1994) A fluorescence assay demonstrating stimulation of phagocytosis by haemolymph molecules of *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 40(12), 1045-1049
- ROJAS E., POLLARD H. B., HAIGLER H. T., PARRA C. & BURNS A. L. (1990) Calcium-activated Endonexin II forms Calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* 265(34), 21207-21207
- ROTHHUT B. (1997) Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 53, 522-526

- ROURKE I. J. & EAST P. D. (1997) Evidence for gene conversion between tandemly duplicated cytoplasmic actin genes of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Mol Evol* 44, 169-177
- ROWLEY A. F. & RATCLIFFE N. A. (1976a) The granular cells of *Galleria mellonella* during clotting and phagocytic reactions *in vitro*. *Tissue & Cell* 8(3), 437-446
- ROWLEY A. F. & RATCLIFFE N. A. (1976b) A ultrastructural study of *in vitro* phagocytosis of *Escherichia coli* by the hemocytes of *Calliphora erythrocephala*. *J Ultrastruct Res* 55, 193-202
- ROWLEY A. F. & RATCLIFFE N. A. (1981) Insects. In: *Invertebrate blood cells*, Vol. 2 Arthropods to urochordates, invertebrates and compared. Eds. N. A. Ratcliffe & A. F. Rowley, Academic Press, London, UK, pp. 421- 488
- RUSSELL V. W. & DUNN P. E. (1990) Lysozyme in the pericardial complex of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* 20(5), 501-509
- RYBCZYNSKI R. & GILBERT L. I. (1998) Cloning of a beta1 tubulin cDNA from an insect endocrine gland: developmental and hormone-induced changes in mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol* 141, 141-151
- RYBCZYNSKI R. & GILBERT L. I. (2000) cDNA cloning and expression of hormone-regulated heat shock protein (hsp 70) from the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 579- 589
- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLICH H. A. & ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B. & ERLICH H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* 239, 487-491
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. & MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74, 5463-5467
- SARAFIAN T., PRADEL L.-A., HENRY J.-P., AUNIS D. & BADER M.-F. (1991) The participation of annexin II (Calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114, 1135-1147
- SCHERFER C., KARLSSON C., LOSEVA O., BIDLA G., GOTO A., HAVEMANN J., DUSHAY M. S. & THEOPOLD U. (2004) Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* 14, 625-629

- SCHLAEPFER D. D., FISHER D. A., BRANDT M. E., BODE H. R., JONES J. M. & HAIGLER H. T. (1992) Identification of a novel Annexin in *Hydra vulgaris*. J Biol Chem 267(14), 9529-9539
- SCHLEGEL H. G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- SCHLEIFER K. H. & KANDLER O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev 36, 407-477
- SCHOLZ F. R. (2002) Aktivierung von Hämozyten des Tabakschwärmers *Manduca sexta* nach bakteriellen Infektionen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen. URN. urn:nbn:de:hebis:26-opus-7184, URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/718/>
- SCHROTEN H., WOLSKE A., PLOGMANN R., HANISCH F.-G., HACKER J., UHLENBRUCK G. & WAHN V. (1991) Binding of cloned S-fimbriated *E. coli* to human buccal epithelial cells - Different inhibition of binding by neonatal saliva and adult saliva. Zbl Bakt 274, 514-518
- SCHWARTZ L. M., JONES M. E., KOSZ L. & KUAH K. (1993) Selective repression of actin and myosin heavy chain expression during the programmed death of insect skeletal muscle. Dev Biol 158(2), 448-455
- SHARP P. A., SUGDEN B. & SAMBROOK J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical Agarose-Ethidium Bromide electrophoresis. Biochemistry 12(16), 3055-3063
- SHIN W. S., PARK D.-S., KIM S. C. & PARK H.-Y. (2000) Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharide through O-specific chain. FEBS Lett 467(1), 70-74
- SHINITZKY M., KATCHALSKI E., GRISARO V. & SHARON N. (1966) Inhibition of lysozyme by imidazole and indole derivatives. Arch Biochem Biophys 116, 332-343
- SILVA C. P., WATERFIELD N. R., DABORN P. J., DEAN P., CHILVER T., AU C. P. Y., SHARMA S., POTTER U., REYNOLDS S. E. & FRENCH-CONSTANT R. H. (2002) Bacterial infection of a model insect: *Photorehabdus luminescens* and *Manduca sexta*. Cell Microbiol 4(6), 329-339
- SMITH C. W. J. & VALCÁRCEL J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. TIBS 25, 381-388.
- SMITH P. D. & MOSS S. E. (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. TIG 10(7), 241-246
- SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunology. Curr Opin Immunol 10, 23-28

- SPIES A. G., KARLINSEY J. E. & SPENCE K. D. (1986) Antibacterial hemolymph proteins of *Manduca sexta*. *Comp Biochem Physiol* 83B(1), 125-133
- SRITUNYALUCKSANA K., WONGSUEBSANTATI K., JOHANSSON M. W. & SÖDERHÄLL K. (2001) Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 25, 353-363
- STEINER H., HULTMARK D., ENGSTRÖM Å., BENNICH H. & BOMAN H. G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248
- STENBAK C. R., RYU J.-H., LEULIER F., PILI-FOURRY S., PARQUET C., HERVÉ M., CHAPUT C., BONECA I. G., LEE W.-J., LEMAITRE B. & MENGİ-LECREULX D. (2004) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol* 173, 7339-7348
- STETTLER P., TRENCZEK T., WYLER T., PFISTER-WILHELM R. & LANZREIN B. (1998) Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol* 44, 817-831
- STOESSER G., BAKER W., VAN DEN BROEK A., CAMON E., GARCIA-PASTOR M., KANZ C., KULIKOVA T., LEINONEN R., LIN Q., LOMBARD V., LOPEZ R., REDASCHI N., STOEHR P., TULI M. A., TZOUVARA K. & VAUGHAN R. (2002) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* 30(1), 21-26
- STRAGIER P. & LOSICK R. (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 30, 297-341
- STRYER L. (1999) Biochemie. 1. korr. Nachdruck der 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- SUDO T. & HIDAKA H. (1998) Regulation of Calcyclin (S100A6) binding by alternative splicing in the N-terminal regulatory domain of annexin IX isoforms. *J Biol Chem* 273(11), 6351-6357
- SUDO T., MAMIYA N., GOTO M., WATANABE Y. & HIDAKA H. (1996) Isoform-specific intracellular vesicle formation by recombinant annexin XI-A in Sf9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 706-711.
- SUGUMARAN M. & KANOST M. R. (1993) Regulation of insect hemolymph phenoloxidasen. In: *Parasites and Pathogens of Insects*. Eds. N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici. Vol. 1, Academic Press, San Diego, USA, pp. 314-342
- SUN S.-C., LINDSTRÖM I., BOMAN H. G., FAYE I. & SCHMIDT O. (1990) Hemolin: An insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250, 1729-1732

- THEOPOLD U., SAMAKOVLIS C., ERDJUMENT-BROMAGE H., DILLON N., AXELSSO B., SCHMIDT O., TEMPST P. & HULTMARK D. (1996) *Helix pomatia* lectin, an inducer of *Drosophila* immune response, binds to hemomuci, a novel surface mucin. J Biol Chem 271(22), 12708-12715
- THEOPOLD U. & SCHMIDT O. (1997) *Helix pomatia* lectin and annexin V, two molecular probes for insect microparticles: possible involvement in hemolymph coagulation. J Insect Physiol 43(7), 667-674
- THEOPOLD U., SCHMIDT O., SÖDERHÄLL K. & DUSHAY M. S. (2004) Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. Trends Immunol 25(6), 289-294
- THEURKAUF W. E., BAUM H., BO J. & WENSINK P. C. (1986) Tissue-specific and constitutive  $\alpha$ -tubulin genes of *Drosophila melanogaster* code for structurally distinct proteins. Proc Natl Acad Sci USA 83, 8477-8481
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. & GIBSON T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680
- TOWLE C. A., WEISSBACH L., TREADWELL B. V. (1992) Alternatively spliced annexin XI transcripts encode proteins that differ near the amino-terminus. Biochim Biophys Acta 1131, 223-226
- TRENCZEK T. (1998) Endogenous defense mechanisms of insects. Zoology 101(4), 298-315
- TRENCZEK T. & FAYE I. (1988) Synthesis of immune proteins in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia*. Insect Biochem 18(3): 299-312
- TSUZUKI S., IWAMI M. & SAKURAI S. (2001) Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. Insect Biochem Mol Biol 31, 321-331
- URBAN C. & SALTON M. R. J. (1983) Immunochemical analysis of *M. lysodeikticus* (luteus) F<sub>1</sub>-ATPase and its subunits. Biochim Biophys Acta 724, 230-240
- URBAN C. & SALTON M. R. J. (1985) Subunit analysis of latent and non-latent F<sub>1</sub>-ATPase from *M. lysodeikticus* (luteus). Microbios 44, 21-32
- VARNDELL I. M., TAPIA F. J., PROBERT L., BUCHAN A. M. J., GU J., DE MEY J., BLOOM S. R. & POLAK J. M. (1982) Immunogold staining procedure for the localisation of regulatory peptides. Peptides 3(3), 259-272
- VILMOS P. & KURUCZ É. (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunology Letters 62, 59-66
- VOGT R. G., ROGERS M. E., FRANCO M.-D. & SUN M. (2002) A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2

- gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). J Exp Biol 205, 719-744
- WAGO H. & ICHIKAWA Y. (1979) Changes in the phagocytic rate during the larval development and manner of hemocytic reactions to foreign cells in *Bombyx mori*. Appl Entomol Zool 14, 397-403
- WALSH P. S., METZGER D. A. & HIGUCHI R. (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10(4), 506-513
- WANG Y., WILLOTT E. & KANOST M. R. (1995) Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. Insect Mol Biol 4(2), 113-123
- WEIDEMANN B., SCHLETTER J., DZIARSKI R., KUSUMOTO S., STELTER F., RIETSCHEL E. T., FLAD H.-D. & ULMER A. J. (1997) Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. Infection and Immunity 65(3), 858-864
- WERNER T., LIU G., KANG D., EKENGREN S., STEINER H. & HULTMARK D. (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci (USA) 97(25), 13772-13777
- WERNER T., LIU G., KANG D., EKENGREN S., STEINER H. & HULTMARK D. (2003) Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. J Biol Chem 278, 26319-26322
- WHITING M. F. (2002) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. Zoologica Scripta 31, 93-104
- WIEGAND C., LEVIN D., GILLESPIE J. P., WILLOTT E., KANOST M. R. & TRENCZEK T. (2000) Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. Arch Insect Biochem Physiol 45, 95-108
- WILKINS M. R., GASTEIGER E., BAIROCH A., SANCHEZ J.-C., WILLIAMS K. L., APPEL R. D. & HOCHSTRASSER D. F. (1998) Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. In: 2-D Proteome Analysis Protocols. Ed. A. J. Link, Humana Press, Totowa, NJ, USA
- WILLOTT E., TRENCZEK T., THROWER L. W. & KANOST M. R. (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. Eur J Cell Biol 65, 417-423
- WILLOTT E., HALLBERG C. A. & TRAN H. Q. (2002) Influence of calcium on *Manduca sexta* plasmatocyte spreading and network formation. Arch Insect Biochem Physiol 49(4), 187-202

- WILLOTT E. & TRAN H. Q. (2002) Zinc and *Manduca sexta* hemocyte functions. J Insect Sci 2:6. URL: <http://www.insectscience.org/2.6>
- WILSON C. M. (1983) Staining of proteins on gels: Comparisons of dyes and procedures. Methods Enzymol 91, 236-240
- WILSON R., CHEN C. & RATCLIFFE N. A. (1999) Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. J Immunol 162, 1590-1596
- XIA Q.-Y., FUJII H., KUSAKABE T. & BANNO Y. (2001) Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 32(1), 9-14
- XU J., NISHIJIMA M., KONO Y., TANAI K., KATO Y., KADONO-OKUDA K., YAMAMOTO M., SHIMABUKURO M., CHOWDHURY S., CHOI S. K. & YAMAKAWA M. (1995) Identification of a haemocyte membrane protein of the silkworm, *Bombyx mori*, which specifically binds to bacterial lipopolysaccharide. Insect Biochem Molec Biol 25(8), 921-928
- YAMAMOTO R. T. (1969) Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. J Econ Entomol 62(6), 1427-1431
- YOSHIDA H., KINOSHITA K. & ASHIDA M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J Biol Chem 271(23), 13854-13860
- YOUNG J. K., ORTH A. P. & GOODMAN W. G. (2003) Allelic variation in the hemolymph juvenile hormone binding protein gene of *Manduca sexta*. Mol Cell Endocrinol 208, 41-50
- YU K. H., KIM K. N., LEE J. H., LEE H. S., KIM S. H., CHO K. Y. NAM M. H. & LEE I. H. (2002) Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae. Dev Comp Immunol 26, 707-713
- YU X.-Q., GAN H. & KANOST M. R. (1999) Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenoloxidase. Insect. Biochem Mol Biol 29(7), 585-597
- YU X.-Q. & KANOST M. R. (1999) Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. Arch Insect Biochem Physiol 42, 198-212
- YU X.-Q. & KANOST M. R. (2000) Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. J Biol Chem 275, 37373-37381
- YU X.-Q. & KANOST M. R. (2002) Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. Eur J Biochem 269, 1827-1834

- YU X.-Q., ZHU Y.-F., MA C., FABRICK J. A. & KANOST M. R. (2002) Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1287-1293
- YU X.-Q., JIANG H., WANG Y. & KANOST M. R. (2003) Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 197-208
- ZHAO L. & KANOST M. R. (1996) In search for a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *J Insect Physiol* 42(1), 73-79
- ZHU Y., JOHNSON T. J., MYERS A. A. & KANOST M. R. (2003a) Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 541-559
- ZHU Y., WANG Y., GORMAN M. J., JIANG H. & KANOST M. R. (2003b) *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J Biol Chem* 278, 46556-46564



## 7 Anhang A

**Tab. A1:** Bakteriolytische Aktivität in der Hämolymphe von *M. sexta* L5d2–4 nach Injektion verschiedener Bakterien

Injektionsmaterial	Anzahl der Larven n	Lysozym-Äquivalente [µg/ml]				
		Mittelwert $\bar{x}$	$\pm s$	Median $\tilde{x}$	Q <sub>25</sub>	Q <sub>75</sub>
<i>B. megaterium</i> c1	6	<b>12212,6</b>	5842,3	<b>13514,7</b>	7529,5	16251,2
<i>B. megaterium</i> c2	5	<b>10974,4</b>	5280,1	<b>12753,0</b>	6856,0	12753,0
<i>S. aureus</i> c1	5	<b>16828,6</b>	4860,6	<b>15105,1</b>	14276,4	16909,5
<i>S. aureus</i> c2	5	<b>7636,6</b>	1543,5	<b>7675,0</b>	6856,0	9090,5
<i>E. coli</i> c1	5	<b>14395,7</b>	4724,9	<b>13493,2</b>	10767,1	16909,5
<i>M. luteus</i> c3	5	<b>14090,5</b>	2063,8	<b>15105,1</b>	13493,2	15105,1
MS <sup>+</sup> (Kontrolle)	5	<b>3165,5</b>	1174,0	<b>2346,9</b>	2346,9	3899,7
ub (Kontrolle)	10	<b>2639,8</b>	1703,0	<b>2626,8</b>	1240,6	3483,6

Injektionsvolumen 100 µl

c1 = 10<sup>8</sup> Bakterien/100 µl

c2 = 10<sup>9</sup> Bakterien/100 µl

c3 = 10 µg lyophilisierter *M. luteus*/100 µl

MS<sup>+</sup> = Vollsaline

ub = unbehandelt

Korrelationskoeffizient zur Ermittlung der Lysozym-Äquivalente aus den Hemmhöfen:

$$R^2 = 0,9926$$

**Tab. A2:** Lysozym-Äquivalente in der Hämolymphe von *M. sexta* L5d2–3 nach Injektion verschiedener Komponenten der Oberfläche Gram-positiver Bakterien

Injektionsmaterial	Anzahl der Larven n	Lysozym-Äquivalente [µg/ml]				
		Mittelwert $\bar{x}$	$\pm s$	Median	Q <sub>25</sub>	Q <sub>75</sub>
Zellwand-Material	8	<b>13365,7</b>	3399,8	<b>14111,9</b>	12710,9	15560,4
PG < 10 kDa c4	8	<b>9666,4</b>	1553,8	<b>10024,5</b>	9387,7	10526,4
PG < 10 kDa c5	8	<b>8349,4</b>	2317,7	<b>8657,8</b>	6307,7	10526,4
<i>M. luteus</i>	7	<b>10495,3</b>	5021,0	<b>10526,4</b>	7936,3	12522,9
MS <sup>+</sup>	5	<b>4100,9</b>	1932,2	<b>3258,7</b>	3103,4	4817,2
ub	10	<b>1885,0</b>	678,6	<b>1871,9</b>	1510,0	2439,2

Injektionsvolumen: 50 µl

Zellwand-Material & *M. luteus*: c = 10 µg lyophilisiertes Material / 50 µl

PG < 10 kDa = Peptidoglykan-Fragmente mit einer Größe < 10 kDa

c4 = 500 µg PG/50 µl

c5 = 50 µg PG/50 µl

MS<sup>+</sup> = Vollsaline

ub = unbehandelt

Korrelationskoeffizient zur Ermittlung der Lysozym-Äquivalente aus den Hemmhöfen:

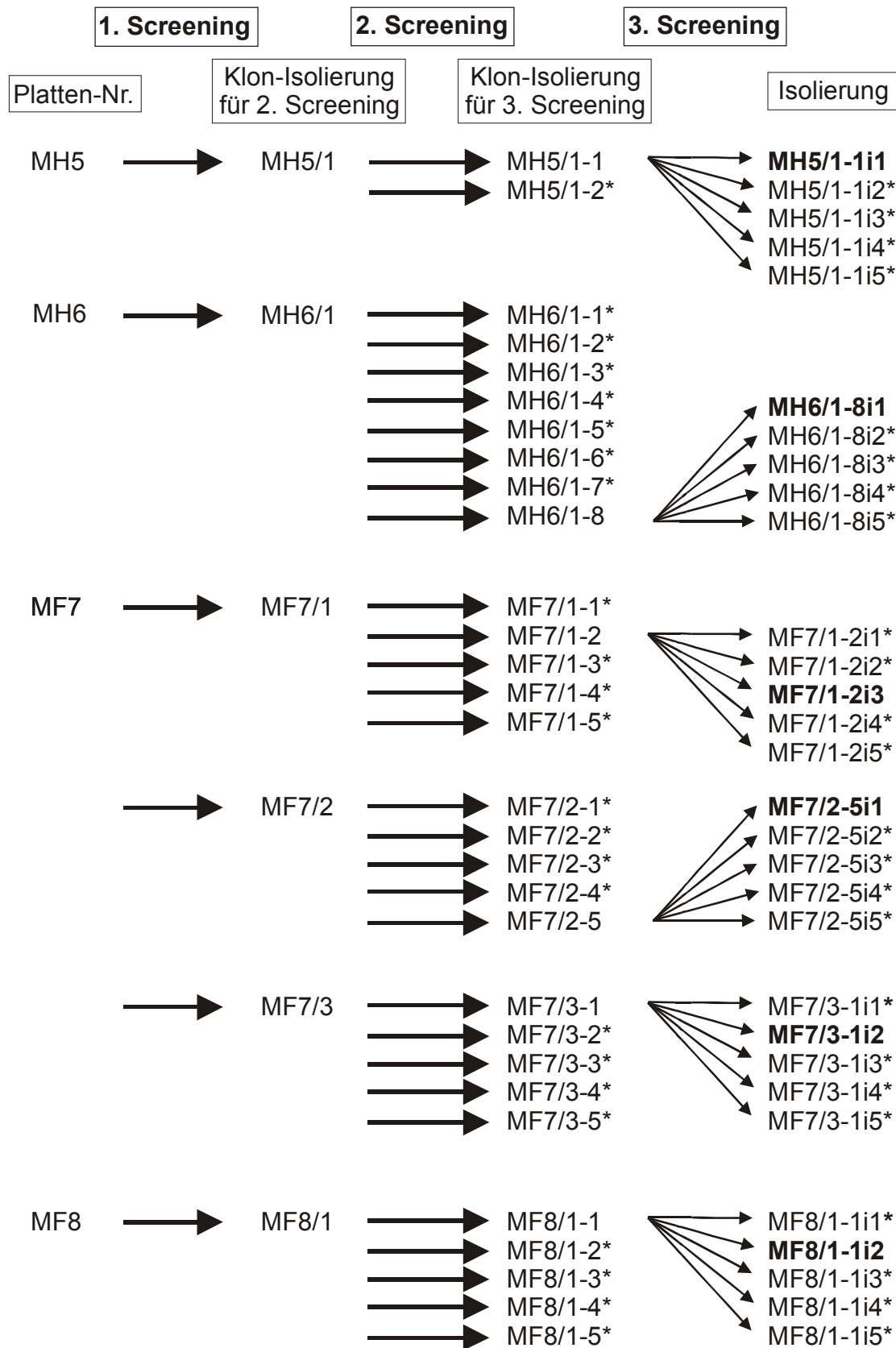
$$R^2 = 0,9857$$

**Tab. A3:** Zusammenfassung der statistischen Auswertung (Mann Whitney Rank Sum Test mit  $P \leq 0,05$ ) der in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven vorhandenen bakteriolytischen Aktivität nach Injektion verschiedener Bakterien (n = Anzahl der Larven)

Injektionsgruppen-Vergleich x mit y		Signifikanz	P =
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,008658
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	ub (n = 10)	signifikant	0,002851
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,01587
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,003990
<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,002688
<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,003990
<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,002688
<i>M. luteus</i> (n = 5)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>M. luteus</i> (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,002687
MS <sup>+</sup> (n = 5)	ub (n = 10)	nicht signifikant	0,3581
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	nicht signifikant	0,6623
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	nicht signifikant	0,3290
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	nicht signifikant	0,3290
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	nicht signifikant	0,6623
<i>B. megaterium</i> c1 (n = 6)	<i>M. luteus</i> (n = 5)	nicht signifikant	0,7922
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	nicht signifikant	0,1508
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	nicht signifikant	0,4206
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	nicht signifikant	0,4206
<i>B. megaterium</i> c2 (n = 5)	<i>M. luteus</i> (n = 5)	nicht signifikant	0,3095
<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	nicht signifikant	0,5476
<i>S. aureus</i> c1 (n = 5)	<i>M. luteus</i> (n = 5)	nicht signifikant	0,5476
<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>S. aureus</i> c2 (n = 5)	<i>M. luteus</i> (n = 5)	signifikant	0,007937
<i>E. coli</i> c1 (n = 5)	<i>M. luteus</i> (n = 5)	nicht signifikant	1,0000

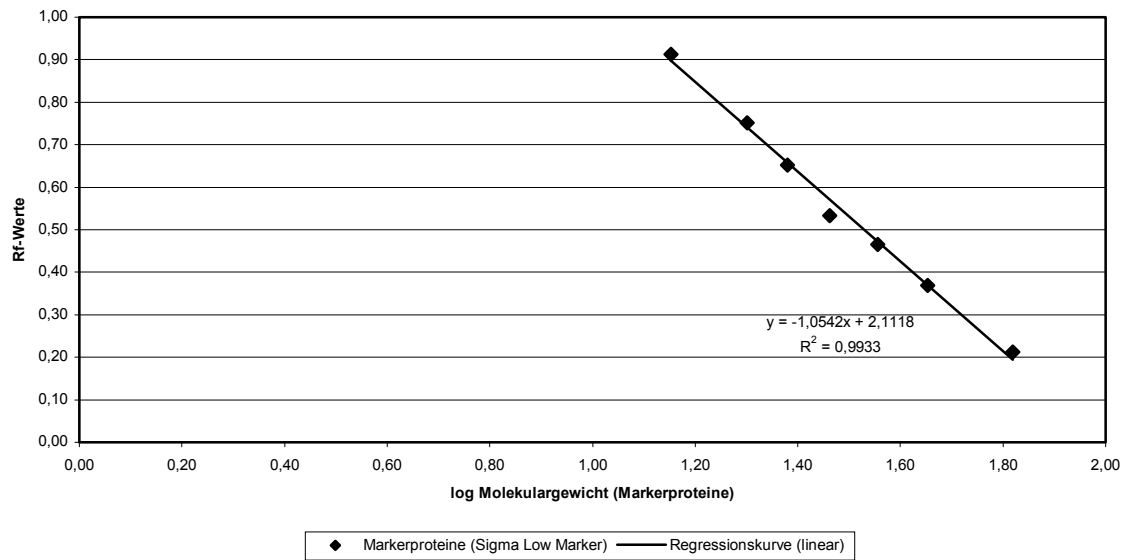
**Tab. A4:** Zusammenfassung der statistischen Auswertung (Mann Whitney Rank Sum Test mit  $P \leq 0,05$ ) der in der Hämolymphe von *M. sexta*-Larven vorhandenen bakteriolytischen Aktivität nach Injektion verschiedener Komponenten der Oberfläche Gram-positiver Bakterien (n = Anzahl der Larven)

Injektionsgruppen-Vergleich x mit y		Signifikanz	P =
Zellwand-Material (n = 8)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,003108
Zellwand-Material (n = 8))	ub (n = 10)	signifikant	0,000
PG < 10 kDa (c) (n = 8)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,001554
PG < 10 kDa (c) (n = 8)	ub (n = 10)	signifikant	0,000
PG < 10 kDa (d) (n = 8)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,01088
PG < 10 kDa (d) (n = 8)	ub (n = 10)	signifikant	0,000
ganze <i>M. lysodeikticus</i> (n = 7)	MS <sup>+</sup> (n = 5)	signifikant	0,03030
ganze <i>M. lysodeikticus</i> (n = 7)	ub (n = 10)	signifikant	0,000
MS <sup>+</sup> (n = 5)	ub (n = 10)	signifikant	0,0085
Zellwand-Material (n = 8)	ganze <i>M. lysodeikticus</i> (n = 7)	nicht signifikant	0,1893
PG < 10 kDa c4 (n = 8)	ganze <i>M. lysodeikticus</i> (n = 7)	nicht signifikant	0,6943
PG < 10 kDa c5 (n = 8)	ganze <i>M. lysodeikticus</i> (n = 7)	nicht signifikant	0,2810
Zellwand-Material (n = 8)	PG < 10 kDa c4 (n = 8)	signifikant	0,02067
Zellwand-Material (n = 8)	PG < 10 kDa c5 (n = 8)	signifikant	0,006993
PG < 10 kDa c4 (n = 8)	PG < 10 kDa c5 (n = 8)	nicht signifikant	0,3823



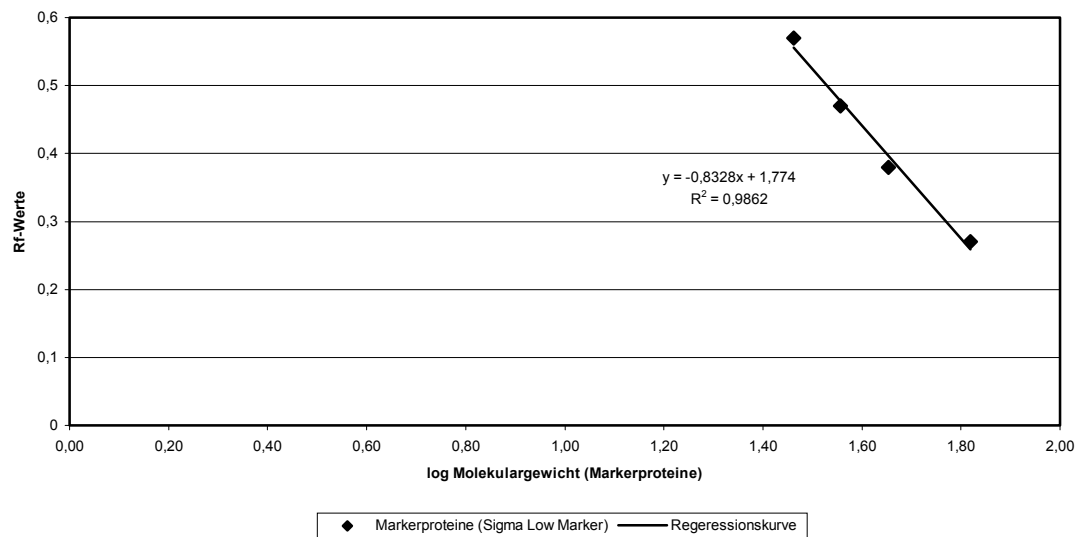
**Abb. A1:** Schema zur Selektion und Isolierung einiger mit mAk MS#78 detektierten Klone aus der Hämözyten-cDNA-Bank von *M. sexta*. Mit \* versehene Klone wurden nicht weiter bearbeitet. Fettgedruckte Klone wurden sequenziert.

## Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Hämolin und Lysozym

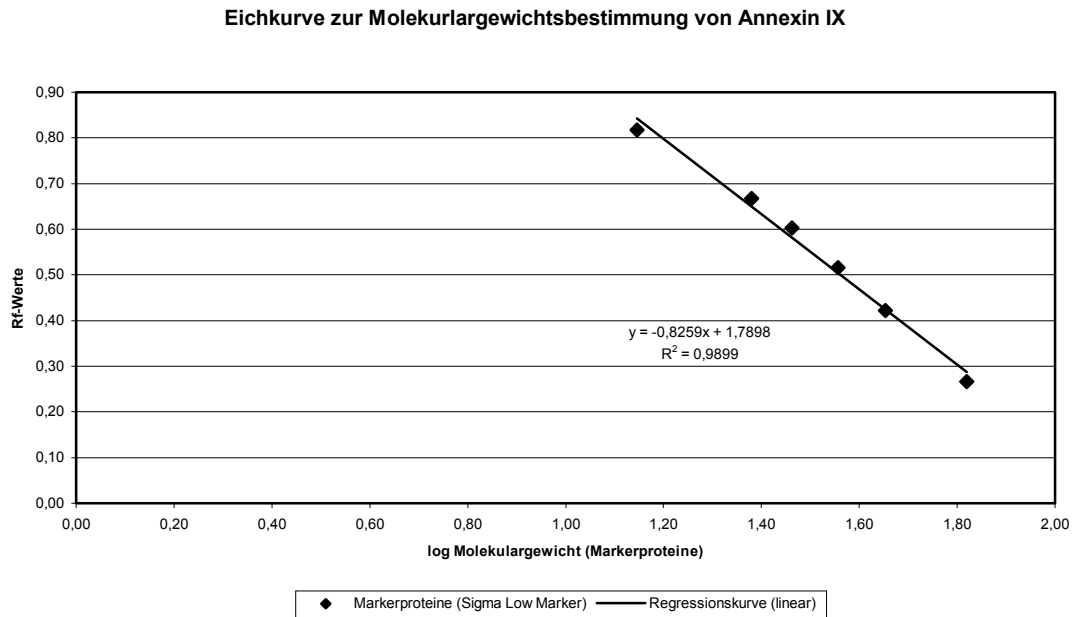


**Abb. A2:** Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung des Hämolins bzw. Lysozyms aus den Markerproteinen (Abb. 6 und 7)

## Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Annexin IX



**Abb. A3:** Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Annexin IX aus den Markerproteinen (Abb. 42, Blot links Hämzytenlysat)



**Abb. A4:** Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Annexin IX aus den Markerproteinen (Abb. 42, Blot rechts Fettkörperlysat)

**Abb. A5:** (folgende Seiten): *Alignment* (Matrix Blossum 62) der cDNA-Sequenzen von drei vollständig sequenzierten Klonen von *M. sexta* MH5/1-1i1, MH6/1-8i1 und MF7/3-1i2 mit drei ansequenzierten Klonen MF8/1-1i2, MF7/1-2i3 und MF7/2-5i1. schwarz: 100 % Übereinstimmung der Basen in allen angegebenen Sequenzen, dunkelgrau: < 100 % - 80 % Übereinstimmung, hellgrau: < 80 % - 60 % Übereinstimmung

		*	20	*	40	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	-----GTGAGGTTGGGTGNGTCGCTAATTTACAAAA	:	31		
MF7/3-1i2	:	CGGAATTCGCTCCGTACAAGTGAGGTTGGGTGTGTCGCTAATTTACAAAA	:	50			
MH5/1-1i1	:	CGGAATTCGCTCCGTACAAGTGAGGTTGGGTGTGTCGCTAATTTACAAAA	:	50			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	CGGAATTCGCTCCGTACAAGTGAGGTTGGGTGTGTCGCTAATTTACAAAA	:	50			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----	:	-		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
		60	*	80	*	100	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	GAATCTTTCAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAAGTGCACCCC	:	81			
MF7/3-1i2	:	GAATCTTTCAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAAGTGCACCCC	:	100			
MH5/1-1i1	:	GAATCTTTCAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAAGTGCACCCC	:	100			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	GAATCTTTCAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAAGTGCACCCC	:	100			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----	:	-		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
		*	120	*	140	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	CACGGTGTAACNCCCGCGGAGCCTTTTCGACTCCCGCNCNCGGATGCGGAGAC	:	131			
MF7/3-1i2	:	CACGGTGTA-CCCCGCGGAGCCTTTTCGAC-CCCGCGGCGGATGCGGAGAC	:	148			
MH5/1-1i1	:	CACGGTGTA-CCCCGCGGAGCCTTTTCGAC-CCCGCGGCGGATGCGGAGAC	:	148			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	CACGGTGTA-CCCCGCGGAGCCTTTTCGAC-CCCGCGGCGGATGCGGAGAC	:	148			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----	:	-		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
		160	*	180	*	200	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	CCTCCGCAAGGCTNTGAAAGGGTTTGGCACCGACGATGAAGGCCATCATC	:	181			
MF7/3-1i2	:	CCTCCGCAAGGCTATGAAAGGGTTTGGCACCGACGA-GAAGGCCATCATC	:	197			
MH5/1-1i1	:	CCTCCGCAAGGCTATGAAAGGGTTTGGCACCGACGA-GAAGGCCATCATC	:	197			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	CCTCCGCAAGGCTATGAAAGGGTTTGGCACCGACGA-GAAGGCCATCATC	:	197			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----	:	-		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
		*	220	*	240	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	GACGTCTCTTTGCCGCCGNGGTATNGTCCAGCGTCTGGAGATCGCTCGAA	:	231			
MF7/3-1i2	:	GACGTCTCTTTGCCGCCGCGGTATCGTCCAGCGTCTGGAGATCGC-CGAA	:	245			
MH5/1-1i1	:	GACGTCTCTTTGCCGCCGCGGTATCGTCCAGCGTCTGGAGATTGC-CGAA	:	245			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	GACGTCTCTTTGCCGCCGCGGTATCGTCCAGCGTCTGGAGATCGC-CGAA	:	245			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----	:	-		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
		260	*	280	*	300	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	ACTTNCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATNAGCGAGTTGAAGAGCGA	:	281			
MF7/3-1i2	:	ACTTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATCAGCGAGTTGAAGAGCGA	:	295			
MH5/1-1i1	:	ACTTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATCAGCGAGTTGAAGAGCGA	:	295			
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	ACTTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATCAGCGAGTTGAAGAGCGA	:	295			
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MH6/1-8i1	:	-----	-----GCGAGTTGAAGAGCGA	:	16		
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	-----	:	-		

```

          *           320           *           340           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ACTGAGCGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTTGCGCTGATGACCCCCCTGC : 331
MF7/3-1i2       : ACTGAGCGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTTGCGCTGATGACCCCCCTGC : 345
MH5/1-1i1       : ACTGAGCGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTTGCGCTGATGACCCCCCTGC : 345
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ACTGAGCGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTTGCGCTGATGACCCCCCTGC : 345
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : ACTGAGCGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTTGCGCTGATGACCCCCCTGC : 66
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

```

          360           *           380           *           400
MF7/1-2i3_5'-Ende : CACACTACTACGCTAANGAACTGNTCNACNCCGTTGCCGGGACCTCGGTA : 381
MF7/3-1i2       : CACACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTTCGC-GGGA-CTCGGTA : 393
MH5/1-1i1       : CACACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTTCGC-GGGA-CTCGGTA : 393
MF8/1-1i2_5'-Ende : -----GC-GGGA-CTCGGTA : 13
MF7/2-5i1_5'-Ende : CACACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTTCGC-GGGA-CTCGGTA : 393
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : CACACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTTCGC-GGGA-CTCGGTA : 114
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

```

          *           420           *           440           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : CCGACGAGGAGGCGATNATTTGAGATCCCTGTGCACTCTCTCAAATAAG : 431
MF7/3-1i2       : CCGACGAGGAGGCGATCATTGAGATCC-TGTGCACACTCTCTCAAATAAG : 441
MH5/1-1i1       : CCGACGAGGAGGCGATCATTGAGATCC-TGTGCACACTCTCTCAAATAAG : 441
MF8/1-1i2_5'-Ende : CCGACGAGGAGGCGATCATTGAGATCC-TGTGCACACTCTCTCAAATAAG : 61
MF7/2-5i1_5'-Ende : CCGACGAGGAGGCGATCATTGAGATCC-TGTGCACACTCTCTCAAATAAG : 441
MF7/2-5i1_3'-Ende : -----NCGCGATCA-T-NAGATCN---TGGNCCATTTCAAATAAG : 36
MH6/1-8i1       : CCGACGAGGAGGCGATCATTGAGATCC-TGTGCACACTCTCTCAAATAAG : 162
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

ggcgat a t agatc tg c t tcaaa ta g

```

          460           *           480           *           500
MF7/1-2i3_5'-Ende : GCANTCCGCACCATCTNAGCTTTTCTACGATCAATTATACAACAAGNAGCT : 481
MF7/3-1i2       : GCA-TCCGCACCATCTCAGCTTTTCTACGAACAATTATACAACAAG-AGCT : 489
MH5/1-1i1       : GCA-TCCGCACCATCTCAGCTTTTCTACGAACAATTATACAACAAG-AGCT : 489
MF8/1-1i2_5'-Ende : GCA-TCCGCACCATCTCAGCTTTTCTACGAACAATTATACAACAAG-AGCT : 109
MF7/2-5i1_5'-Ende : GCA-TCCGCACCATCTCAGCTTTTCTACGAACAATTATACAACAAG-AGCT : 489
MF7/2-5i1_3'-Ende : GNA-CCCGCA-CTTTTNAAGN-TTTTANGANCAATTATACA-CAAG-AGNT : 81
MH6/1-8i1       : GCA-TCCGCACCATCTCAGCTTTTCTACGAACAATTATACAACAAG-AGCT : 210
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

g a ccgca c t t ag tt ta ga caattataca caag ag t

```

          *           520           *           540           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : TNGGAA-TNGGATCTGAAAGGCGACACATCTNNGNCANTTTTAAAAAGGC : 530
MF7/3-1i2       : T-GGAA-TCGGATCTGAAAGGCGACACATCT-GGCCACTT-C-AAGAGGC : 534
MH5/1-1i1       : T-GGAA-TCGGATCTGAAAGGCGACACATCT-GGCCACTT-C-AAGAGGC : 534
MF8/1-1i2_5'-Ende : TGGAA-CCNCATCTGAAAGGCGACACATCT-GGCCACTT-C-AAGAGGC : 155
MF7/2-5i1_5'-Ende : T-GGAA-TCGGATCTGAAAGGCGACACATCT-GGCCACTT-C-AAGAGGC : 534
MF7/2-5i1_3'-Ende : --GGA--TCGGATNT-AAAGGCGACACATCT-G-NCCNTT-C-AAAAGGC : 122
MH6/1-8i1       : T-GGAA-TCGGATCTGAAAGGCGACACATCT-GGCCACTT-C-AAGAGGC : 255
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

g a at t aaaggcgacacatct g c tt c aa aggc

```

          560           *           580           *           600
MF7/1-2i3_5'-Ende : TGCAGTGTTTTCCCTATGCTATGGCCCANACCGTTGTTATNAGACTNCAA : 580
MF7/3-1i2       : TGT-GTGTTTTCC-TATG-TATGGCC---AACCGTGATGAGAA----CCA : 574
MH5/1-1i1       : TGT-GTGTTTTCC-TATG-TATGGCC---AACCGTGATGAGAA----CCA : 574
MF8/1-1i2_5'-Ende : TGT-GCGTTT-CONATG-TATGGCC---AACCGTGATGAGAA----CCA : 195
MF7/2-5i1_5'-Ende : TGT-GTGTTTTCC-TATG-TATGGCC---AACCGTGATGAGAA----CCA : 574
MF7/2-5i1_3'-Ende : TGT-GTG-TTNCNATG-TAN-GCC---ACCCGTNATNA-AA----CCA : 160
MH6/1-8i1       : TGT-GTGTTTTCC-TATG-TATGGCC---AACCGTGATGAGAA----CCA : 295
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

tg g g tt cc tatg ta g c ccgt t a c a



		*	620						*	640						*
MF7/1-2i3_5'-Ende :	GGTNT	TGN	GAC	CNAAG	GC	CGA	TAT	GTN	CTG	AC	NNC	TGA	NNC	CT	:	630
MF7/3-1i2 :	GGGTG	TG-	GA-	CGAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GCTGA	-	GGCCC	-	T	:	616
MH5/1-1i1 :	GGGTG	TG-	GA-	CGAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GCTGA	-	GGCCC	-	T	:	616
MF8/1-1i2_5'-Ende :	GGGTG	TG-	GA-	CNAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GCTGA	-	GGCCC	-	T	:	237
MF7/2-5i1_5'-Ende :	GGGTG	TG-	GA-	CGAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GCTGA	-	GGCCC	-	T	:	616
MF7/2-5i1_3'-Ende :	GG--	GTGG	GGA-	CGAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GNTGA	-	GGCCN	-	T	:	201
MH6/1-8i1 :	GGGTG	TG-	GA-	CGAAG	GC-	CGCTA	-	GGGCT	GAC-	GCTGA	-	GGCCC	-	T	:	337
MF8/1-1i2_3'-Ende :	-----														:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende :	-----														:	-
	gg	tq	ga	c	aa	gc	qc	cg	ta	g	ctgac	tga	g	c	t	

		660		*		680		*		700					
MF7/1-2i3_5'-Ende :	GGC	CAACNN	CCN	CT	CGN	AT	GN	GACAT	TGGG	GCAC	NN	ACNAGNANC	- :	679	
MF7/3-1i2 :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGC	GCAC	CG	-A	-----CG	:	651
MH5/1-1i1 :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGG	GCAC	CG	-A	-----CG	:	651
MF8/1-1i2_5'-Ende :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGG	GCAC	CG	-A	-----CG	:	272
MF7/2-5i1_5'-Ende :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGG	GCAC	CG	-A	-----CG	:	651
MF7/2-5i1_3'-Ende :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGG	GCAC	CG	-A	-----CG	:	236
MH6/1-8i1 :	GGC	CAA	---	CGCC	GGCG	-A	---	GGGACAA	TGGG	GCAC	CG	-A	-----CG	:	372
MF8/1-1i2_3'-Ende :	-----													:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende :	-----													:	-
	ggc	caa		c	c	q	cq	a	q	gaca	tggg	gcacc	a		c

[illegible]

				760		*		780		*		800		
MF7/1-2i3_5'-Ende :	NCCNNTT	GANAGTNN	TTCNTT	CTGNCCTTAC	GNAGGC	CNCTTG	GACT-T	:	775					
MF7/3-1i2 :	GCTGA-	GACAG-ATATT	CG--CTGAATTC	-G-AGGC	GTT---	GACT-G	:	732						
MH5/1-1i1 :	GCTGA-	GACAG-ATATT	CG--CTGAATTC	-G-AGGC	GTT---	GACT-G	:	732						
MF8/1-1i2_5'-Ende :	GCTGA-	GACAG-ATATNCG	-CTGAATTC	-G-AGGC	ACTN---	GACTTG	:	355						
MF7/2-5i1_5'-Ende :	GCTGA-	GACAG-ATATT	CG--CTGAATTC	-G-AGGC	GTT---	GACT-G	:	732						
MF7/2-5i1_3'-Ende :	GNTGA-	GACAG-ATATT	CG--CTGAATTC	-G-AGGC	GTT---	GACT-G	:	317						
MH6/1-8i1 :	GCTGA-	GACAG-ATATT	CG--CTGAATTC	-G-AGGC	GTT---	GACT-G	:	453						
MF8/1-1i2_3'-Ende :													:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende :													:	-
				ga ag t t c ctg t g aggc gact										

[illegible]

	860	*	880	*	900				
MF7/1-2i3_5'-Ende :	TTNNTTTTGA	AATN-CANN	NAN-TA-AG	CGTNTNTNC	TTCNC--CTN	: 863			
MF7/3-1i2 :	GCA	TC--GAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGC	-GTAAAG-AGCA : 819			
MH5/1-1i1 :	GCA	TC--GAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGC	-GTAAAG-AGCA : 819			
MF8/1-1i2_5'-Ende :	GCA	TC-TGAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGCC	GTAAAGTAGCA : 449			
MF7/2-5i1_5'-Ende :	GCA	TC--GAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGC	-GTAAAG-AGCA : 820			
MF7/2-5i1_3'-Ende :	GCA	TC--GAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGC	-GTAAAG-AGCA : 404			
MH6/1-8i1 :	GCA	TC--GAG	AAGGG-CATG	CTTGC	TATTGTCAAATGC	-GTAAAG-AGCA : 540			
MF8/1-1i2_3'-Ende :	-----					: -			
MF7/1-2i3_3'-Ende :	-----					: -			
	t	ga	ca	c	ta	q q	t	t	q

```

          *           920           *           940           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : TTTNTTCGGAAA--NAGCGNGTNAANNA--GGAAGGG-TNCGG--GATTNN : 906
MF7/3-1i2         : A-GGTTGGTTT--CTTC-GCTGAGCGCCT-GTACTA-TTCCAT-GA-AAG : 861
MH5/1-1i1         : A-GGTTGGTTT--CTTC-GCTGAGCGCCT-GTACTA-TTCCAT-GA-AAG : 861
MF8/1-1i2_5'-Ende : A-GGTTGNTTTTCTTCNGCTGAGCGCCTATTACTAATCCATTGANAAA : 498
MF7/2-5i1_5'-Ende : NGGGTGGNTTT--NTTC-GCTGAGCGCCT-GTACTA-TTCCAT-GN-AAG : 863
MF7/2-5i1_3'-Ende : A-GGTTGGTTT--CTTC-GCTGAGCGCCT-GTACTA-TTCCAT-GA-AAG : 446
MH6/1-8i1         : A-GGTTGGTTT--CTTC-GCTGAGCGCCT-GTACTA-TTCCAT-GA-AAG : 582
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -
          t           c           t a           a           t c           g

```

```

          960           *           980           *           1000
MF7/1-2i3_5'-Ende : NCTT-CGTCTCGANCCN--GCN-NGNT-ACCTAATACCTTGNA-NAG : 950
MF7/3-1i2         : GGCT-CGGTACAAATGATAAG-ACCC-TCATCAGAAATCGTGGTCAGC--- : 905
MH5/1-1i1         : GGCT-CGGTACAAATGACAAG-ACCC-TCATCAGAAATCGTGGTCAGC--- : 905
MF8/1-1i2_5'-Ende : GGCTT-NGNTCAAATGACAAGGACCCCTTATCAGAAAT-TNTNNGTNAGN : 547
MF7/2-5i1_5'-Ende : GGCT-CGGTANAA-TGATAAG-ACCC-T-TNNAATCGNNGGTCAGC--- : 905
MF7/2-5i1_3'-Ende : GGCT-CGGTACAAATGATAAG-ACCC-TCATCAGAAATCGTGGTCAGC--- : 490
MH6/1-8i1         : GGCT-CGGTACAAATGATAAGACCC-TCATCAGAAATCGTGGTCAGC--- : 626
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -
          t c           a           g c t           a

```

```

          *           1020           *           1040           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : GGGGTCN-NNC-ANANTNACNN---CAATCG-ANCT--NTTC--TTTAT : 991
MF7/3-1i2         : -CGCT-CCGAGA-TCGACCTCGGG--GACATC-AAAC-AGG-C-ATTCCT : 946
MH5/1-1i1         : -CGCT-CCGAGA-TCGACCTCGGG--GACATC-AAAC-AGG-C-ATTCCT : 946
MF8/1-1i2_5'-Ende : TCGCTTCCGAGAAATCGACCTNGNCGTGACATTTAAACCAGG-CNATTCCT : 596
MF7/2-5i1_5'-Ende : -CGCT-CCGNAA-TCGACCTNGGG--GAATNA-AAAN--GG--NTTNT : 944
MF7/2-5i1_3'-Ende : -CGCT-CCGAGA-TCGACCTCGGG--GACATC-AAAC-AGG-C-ATTCCT : 531
MH6/1-8i1         : -CGCT-CCGAGA-TCGACCTCGGG--GACATC-AAAC-AGG-C-ATTCCT : 667
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -
          g t c a           a           a           tt t

```

```

          1060           *           1080           *           1100
MF7/1-2i3_5'-Ende : ---A-CAAATTAG-NGNGTTCAANCNNGTNTTTCNGNAAACNT-ANNT-CG : 1035
MF7/3-1i2         : T-GA-CAAATACG-G---CAAGCCCC--TGG-AGAG--CTGG--AT-CG : 981
MH5/1-1i1         : T-GA-CAAATACG-G---CAAGCCCC--TGG-AGAG--CTGG--AT-CG : 981
MF8/1-1i2_5'-Ende : TTGANCANNTACG-GN---CAAAGCCCCTTGGNAGTA-ACTGGGGATTGG : 641
MF7/2-5i1_5'-Ende : -G----- : 945
MF7/2-5i1_3'-Ende : T-GA-CAAATACG-G---CAAGCCCC--TGG-AGAG--CTGG--AT-CG : 566
MH6/1-8i1         : T-GA-CAAATACG-G---CAAGCCCC--TGG-AGAG--CTGG--AT-CG : 702
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

```

          *           1120           *           1140           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : NGGGNNCTTAN-----TAACATGGTNTTN---CTTTGTTACATANAN : 1074
MF7/3-1i2         : CT----- : 983
MH5/1-1i1         : CT----- : 983
MF8/1-1i2_5'-Ende : CT----- : 643
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : CT----- : 568
MH6/1-8i1         : CTGTAAGTTGTCTTGCAATAATCATTCATTCGGCACTTTCATACGAAAGC : 752
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

```

          1160           *           1180           *           1200
MF7/1-2i3_5'-Ende : GT---GTAANCCCTCTNGAAGNTGTGNNTNCCT----- : 1104
MF7/3-1i2         : ----- : -
MH5/1-1i1         : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1         : GTCACCTGAATATGCTTGATTTGCTTCATATGAGAAACGCATTGAAAATT : 802
MF8/1-1i2_3'-Ende : ----- : -
MF7/1-2i3_3'-Ende : ----- : -

```

	*	1220	*	1240	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TATCAGTTTAGTTTGATGTTGAATTTAAAGTTTCATTGATTATTACTGT	:		:	852
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1260	*	1280	*	1300	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	ATTGATTGATATAACCTATTGCATTTTAAATAACTGTCGTCCTAATCAT	:		:	902
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1320	*	1340	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TGTGTTTCATAAAATTAACCTCATTTGTCCGTTGTTTGTCTAATGTCTAACA	:		:	952
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1360	*	1380	*	1400	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	AGCATGTGTATTTCTATGTTTTATATTTAATAGAAATATATAAACTGACC	:		:	1002
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1420	*	1440	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	CATACTTCTTTACGATACTGTTGTAATTGTGGCTGTGCATTGCCATA	:		:	1052
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1460	*	1480	*	1500	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	CGACACATCACCTATAAAATCTAACCCCTCATTATAATATATACTTATTAT	:		:	1102
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1520	*	1540	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	ACAGATCTGTTTATAGGAATATTCAAGATTTAGTATAAAAGTCAATAATTT	:		:	1152
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1560	*	1580	*	1600	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TGTGAAGTTATCAGCAAATGTGTTAATTGTTCTAACAGAGAAAAGCACTA	:		:	1202
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1620	*	1640	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	ATTGGCATATGTAAAAGGTTTATTTGTGCGACAAATGAATACAGTAGTTCA	:		:	1252
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1660	*	1680	*	1700	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	GAATCCGTTTTTGATTGCAGGACGACACTTCCGGGGATTACAAGAAGGCTT	:		:	1302
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1720	*	1740	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TATTGACCCTAGTCGAATAAATTGTGTGGTTCCCGAATGGTCAGGATCAC	:		:	1352
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	1760	*	1780	*	1800	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TATGGTTGATATCCACCTATCTCGAATATTTTAAGTTTTTTTTTTGTCAA	:		:	1402
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-

	*	1820	*	1840	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TTTGCTAGATTATTAAGACAGTTAGGGCTTGACGGCCGATCGTAAAGTAA	:		:	1452
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	AAAAAAGNGACAATCNCCTATNAGNGAAANNNGNCANANGACCGCATNNGCT	:		:	84
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	TTTTCATCNCCANAANCAACAAAATTNNATTNNCNCGTTGACGCCCTNG	:		:	82

	1860	*	1880	*	1900	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	AACAAGCACAAACGCTAGTCTAGACGTTTCGCGGTTCGTCGGTGTGCTAGGT	:		:	1502
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	TAACCGGNGGACACACCGNAAAGATCCCNNAANNAANGAGGNGNNAG	:		:	134
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	TTAATATNCCAATANGGGCTCNGGCCAAAAACANGAATAACCCCTCCTC	:		:	132

	*	1920	*	1940	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TATCGTGAGATGTAAATTTATTTGAGATCTGTATAGTTCGCTTGTGAGCA	:		:	1552
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	GNANAANAACNAACGCCTCNANCANNANAGGGNCCANNNCNNCNCNAGNA	:		:	184
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	NNAAATTCGTGTATACCACACNTNCCAANAAATNCTCCCTAGACNANCT	:		:	182

	1960	*	1980	*	2000	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	CGGTCCCGGTTCATGTAACCTCTCCGTAGCTAACAGCTTTATGTGTCGCGC	:		:	1602
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	TCNCNCCG-----GGNNACNTCGNGACAGG-----CATTC-	:		:	215
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	ANAAACCNAAACNTTTCNTTTACNCNNAATNCCNCCCAAGACNCNCCTC	:		:	232

	*	2020	*	2040	*	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	TCGTGCACGAGGTAACGGTTCCTCATTAGTTTGTCTAGTTTACAAAGT	:		:	1652
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	-----TTNTCCAATACGCCAAGNCCCT-----GG--AANATATGG	:		:	248
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	AAAAANACCTGGAGTCTACNTANAGANNNACNAAGAGAAGACCCCATCT	:		:	282

	2060	*	2080	*	2100	
MF7/1-2i3_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/3-1i2	:	-----GAGG-A-CAT-AGGAGGT-CCGC-TC-GG-CG	:		:	1008
MH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-
MF8/1-1i2_5'-Ende	:	-----TGAGGGA-CAT-AGGAGGTTCGGNTTTGGCCG	:		:	675
MF7/2-5i1_5'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MF7/2-5i1_3'-Ende	:	-----	:	-----	:	-
MH6/1-8i1	:	AGTTGTTGGTTTTTTCAGGAGG-A-CAT-AGGAGGT-CCGC-TC-GGC-G	:		:	1694
MF8/1-1i2_3'-Ende	:	ANCNCAAAAGAACAAAGAGG-ANCCGCCANGAANANACT--TCTT----	:		:	291
MF7/1-2i3_3'-Ende	:	CCNNANCCNACTTACANCNAATNCACNCNAAANTNTTTTGANCNAAANC	:		:	332

```

*           2120           *           2140           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : AACTCCT-ATCAACAATGTGTTACTAAAGCCTACACTGCTAT-AACATTA : 1056
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : AANTNTCNTNNTNAAANAGACG-CTGGTTAACTCAAANACCCTNCNCCTN : 724
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : AACTCCT-ATCAACAATGTGTTACTAAAGCCTACACTGCTAT-AACATTA : 1742
MF8/1-1i2_3'-Ende : AANNAACNATTNTNTATNTG--A-GAAACNNGNCANTTAAANAACNATA : 338
MF7/1-2i3_3'-Ende : ACNACNCNNNNTTTTNTNAAACNCCTCTTTTGNCNCTNCCNATANNATTN : 382

```

```

           2160           *           2180           *           2200
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : A-CACCT-CA-GTATTACGA-G-CGCCATT-CCGTT-ATACG-CCAAACGCA : 1098
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : G-TCTTTTANC-ATNNNAACNCTTCNGNTNNTTANCGGAGTCGCCCTTT : 772
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : A-CACCT-CA-GTATTACGA-G-CGCCATT-CCGTT-ATACG-CCAAACGCA : 1784
MF8/1-1i2_3'-Ende : ANCACTACAAGTATANC-ANGNCNCCATTNCGGTTNNTACGACCAACACA : 387
MF7/1-2i3_3'-Ende : NGCNGTAGCTTNCCTCNTTCCCNNTTAAATATCCCNCCANTNCCNCCAN : 432

```

```

*           2220           *           2240           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : GTGT-CAA--GTAAAGC-AAAC---TA---TTTATTGCATCTA-TTGTA : 1137
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : NNNGGTTTT-GTACGTCCCAACGTCTAGTGGTTAAANTATACA-TCNANG : 820
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : GTGT-CAA--GTAAAGC-AAAC---TA---TTTATTGCATCTA-TTGTA : 1823
MF8/1-1i2_3'-Ende : GTGTGCAAG-GNAAAACCAATC---TATTTTT--NTGCATNTAATTGNAN : 431
MF7/1-2i3_3'-Ende : TTTTCNAANATTAAAAANCCCNAAACCCTATAGTTNATNCCGCTCCCTTN : 482

```

```

           2260           *           2280           *           2300
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : CCGAGTACACTT-ATGTGC-ATTTTAAAGACA--TTATATAATTA-ATTT : 1182
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : CNNTTCTAATTT--G-GCNATNTNTTGTGANCCCTTNCGNACCNCNTNC : 867
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : CCGAGTACACTT-ATGTGC-ATTTTAAAGACA--TTATATAATTA-ATTT : 1868
MF8/1-1i2_3'-Ende : CNGAGNACNNTTAATGTGC-TTTTAAANNCA--TTTATATTATTTATTT : 478
MF7/1-2i3_3'-Ende : GNGTNATGCTCACANTNANCCNNNNNTNNTANTCTTTTTTAAACACCCC : 532

```

```

*           2320           *           2340           *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : AA-GCT---ATTTAA--TCATTGTGATTT-CCATTCTCA-TGTATAGTC- : 1223
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : TATGGTGNCNTTTTAAATNGAACNCNTTN-TTATGNNCN-TGCAATTAAA : 915
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : AA-GCT---ATTTAA--TCATTGTGATTT-CCATTCTCA-TGTATAGTC- : 1909
MF8/1-1i2_3'-Ende : AAACCT---ATTTAANCCTTGT--GATTTCCCATTCCTCAGTGTANAGTCG : 523
MF7/1-2i3_3'-Ende : CCTATNTNANTNTNCATTTTAAACCATCTTTAACNCCCATTGNNATTNNC : 582

```

```

           2360           *           2380           *           2400
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : A-GTA-CAA-GAATGC-A-CGTTT--GAAGTTTGAGCGCAGTGGTTTGA : 1266
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : NGCT--CTTTTGATT-CNANC-TTGTNGTA-TTNTNCCNTTATC--TACA : 958
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : A-GAA-CAA-GAATGC-A-CGTTT--GAAGTTTGAGCGCAGTGGTTTGA : 1952
MF8/1-1i2_3'-Ende : A-GNANCCAAAGAATGC-A-CNTTT--AAAAGTTTNGCGCAATGGTTTAA : 569
MF7/1-2i3_3'-Ende : CNCTCNCCNNCNCAAAATCTCAAANCACCANAAAAACCCCNCTTTTAA : 632

```

```

                *      2420      *      2440      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : ACTA-TGGGCCAGTTTATTT-TGTTT-GCTAACATGTGAAGCGTGAGCGC : 1313
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : A-GGGTTTTT--GGTCCNNTTCTCCACNAAATGNCCCGCTNTTGGAAAAAT : 1005
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : ACTA-TGGGCCAGTTTATTT-TGTTT-GCTAACATGTGAAGCGTGAGCGC : 1999
MF8/1-1i2_3'-Ende : ANTAGTGGACCAGTTTATTTTNTGTTTCGGCTAACATGTNAAAGCGTGAGCGC : 619
MF7/1-2i3_3'-Ende : NTTTTAAACNCCCNGTNNATTTATAANANAATNANCCNCNTATTTTTTCT : 682

```

```

                2460      *      2480      *      2500
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : GTTTT-CCGCTGTTGTT-TACA-GGATGAC-CT---GACTGGTGACTTCA : 1356
MH5/1-1i1       : ----- : 1005
MF8/1-1i2_5'-Ende : CATGCACCGNTCATGNCNTTTAN-GAN-AC-NNTGAGT-CTC-CT--- : 1047
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : -----GATGAC-CT---GACTGGTGACTTCA : 590
MH6/1-8i1       : GTTTT-CCGCTGTTGTT-TACA-GGATGAC-CT---GACTGGTGACTTCA : 2042
MF8/1-1i2_3'-Ende : GTTTC-CCGNTGTTGTTTACANAA-NGAC-CT---NANTGGTNNCTTCA : 663
MF7/1-2i3_3'-Ende : NTTCCANCNACCTTTTAAANCN-G-TGACACNCTTTTNCNNNTNTNT : 730
                        g      ac

```

```

                *      2520      *      2540      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : GGAATGTGCTAG-TCACACTTTGTGCTTAACCTGCAATACATTAGA-GC : 1404
MH5/1-1i1       : GGAATGTGCTAG-TCACACTTTGTGCTTAACCTGCAATACATTAGA-GC : 1053
MF8/1-1i2_5'-Ende : -----GTN--A---A-TTTTGGG-TTCGNTCAACAATGTNTGNAACGC : 1084
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : GGAATGTGCTAG-TCACACTTTGTGCTTAACCTGCAATACATTAGA-GC : 638
MH6/1-8i1       : GGAATGTGCTAG-TCACACTTTGTGCTTAACCTGCAATACATTAGA-GC : 2090
MF8/1-1i2_3'-Ende : GGAATGTGCTAGGTCNCCCTTTGTGCTTAACCTGCAATACATTAGAGGC : 713
MF7/1-2i3_3'-Ende : TNNACCNAAAANTCNCACCTNGNCANTNCANAAATNAACTTTANCC : 780
                        a      g      aat      a      c

```

```

                2560      *      2580      *      2600
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : TGTATTTTTATATGAATATTTGGTTAAGCTTAGCATGTTGTTGCGGAAC : 1454
MH5/1-1i1       : TGTATTTTTATATGAATATTTGGTTAAGCTTAGCATGTTGTTGCGGAAC : 1103
MF8/1-1i2_5'-Ende : CGCTNCCG-- : 1093
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : TGTATTTTTATATGAATATTTGGTTAAGCTTAGCATGTTGTTGCGGAAC : 688
MH6/1-8i1       : TGTATTTTTATATGAATATTTGGTTAAGCTTAGCATGTTGTTGCGGAAC : 2140
MF8/1-1i2_3'-Ende : TGTATTTTTATATNAATATTTGGTTAAGCTTAGCATGTTGTTGCGGAAC : 763
MF7/1-2i3_3'-Ende : CNCNTNGTNTTNCNCCCNCAANCCNTNAAAANTNGTTTTTTANNNAAT : 830

```

```

                *      2620      *      2640      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : GCTACAAAGTACAATAATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGCGACTTCAA : 1504
MH5/1-1i1       : GCTACAAAGTACAATAATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGCGACTTCAA : 1153
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : GCTACAAAGTACAATAATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGCGACTTCAA : 738
MH6/1-8i1       : GCTACAAAGTACAATAATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGCGACTTCAA : 2190
MF8/1-1i2_3'-Ende : GCTACAAAGNTCAATAATGGTTTGCAGGACGATACNAAGGGCGACTTCAA : 813
MF7/1-2i3_3'-Ende : NNTTTNTTAANTTTTANCATNTTTTCCNAAANCCNNAANCCNANAN : 880

```

```

                2660      *      2680      *      2700
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : ACACGCGTTACTGACCCTAGTGTCTGTAGGGACGCATACGCATTATACTGC : 1554
MH5/1-1i1       : ACACGCGTTACTGACCCTAGTGTCTGTAGGGACGCATACGCATTATACTGC : 1203
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ACACGCGTTACTGACCCTAGTGTCTGTAGGGACGCATACGCATTATACTGC : 788
MH6/1-8i1       : ACACGCGTTACTGACCCTAGTGTCTGTAGGGACGCATACGCATTATACTGC : 2240
MF8/1-1i2_3'-Ende : ACACGCGTTACTGNCCNAGTGTCTGTANGGACGCATACGCATTATACTGC : 863
MF7/1-2i3_3'-Ende : TGGTTTCCANNCCNTTCCAANNNCACNTTCAACCNCCNNTCATAACCC : 930

```

```

                *      2720      *      2740      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : AGACCGATAGACATGCCTTTGAACCGTATAACTGTTAAGAGATGTTTAGA : 1604
MH5/1-1i1       : AGACCGATAGACATGCCTTTGAACCGTATAACTGTTAAGAGATGTTTAGA : 1253
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : AGACCGATAGACATGCCTTTGAACCGTATAACTGTTAAGAGATGTTTAGA : 838
MH6/1-8i1       : AGACCGATAGACATGCCTTTGACCCGTATAACTGTTAAGAGATGTTTAGA : 2290
MF8/1-1i2_3'-Ende : AGNCCGATAGACANGCCTTTGANGGGTATANCTGTTAANAGATGTTTANA : 913
MF7/1-2i3_3'-Ende : NANTTTNTTANGCNCCNTTCCCNTTTANNTCCNNCCNAAAANCANCCC : 980

```

```

                2760      *      2780      *      2800
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : AATTAAAGCTTGATATTTTTGTGAAAATGAGATATTTATTGGTGCTGTAC : 1654
MH5/1-1i1       : AATTAAAGCTTGATATTTTTGTGAAAATGAGATATTTATTGGTGCTGTAC : 1303
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : AATTAAAGCTTGATATTTTTGTGAAAATGAGATATTTATTGGTGCTGTAC : 888
MH6/1-8i1       : AATTAAAGCTTGATATTTTTGTGAAAATGAGATATTTATTGGTGCTGTAC : 2340
MF8/1-1i2_3'-Ende : AATTAAAGCTTGATATTTTTGTGAAAATGAGATATTTATTGGTGCTGCAC : 963
MF7/1-2i3_3'-Ende : TTTGNCCCNNAANNTTTTAAAAAATTTTNAANTNCCCCCCCCCNANT : 1030

```

```

                *      2820      *      2840      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : TTTTGTTTACATTATACATATTTACATTATAATTATTAAATCACACTATT : 1704
MH5/1-1i1       : TTTTGTTTACATTATACATATTTACATAATAATTATTAAATCACACTATT : 1353
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : TTTTGTTTACATTATACATATTTACATTATAATTATTAAATCACACTATT : 938
MH6/1-8i1       : TTTTGTTTACATTATACATATTTACATTATAATTATTAAATCACACTATT : 2390
MF8/1-1i2_3'-Ende : TTTTGTTNNCATTANACATATTTACANAGATAATTATTAAANCNCACTAT : 1013
MF7/1-2i3_3'-Ende : TTTTTTAAATNAANANTTTTTTGGNGCNGACCTTTTTTNNCCCTTNTCC : 1080

```

```

                2860      *      2880      *      2900
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : ATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- : 1726
MH5/1-1i1       : ATGTATGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- : 1384
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ATGTATGTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- : 973
MH6/1-8i1       : ATGTATGTTTAAAAAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- : 2434
MF8/1-1i2_3'-Ende : TATGNATGTTTCAAAAAAAAAAATNAAAAANGNANTNAAAAACCCAAAA : 1063
MF7/1-2i3_3'-Ende : NNATTTCCNTTNNAAATTTTNANNCCCCCTTTNTNTNTGTCTTCNAAAA : 1130

```

```

                *      2920      *
MF7/1-2i3_5'-Ende : ----- : -
MF7/3-1i2       : ----- : -
MH5/1-1i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_5'-Ende : ----- : -
MF7/2-5i1_3'-Ende : ----- : -
MH6/1-8i1       : ----- : -
MF8/1-1i2_3'-Ende : AN----- : 1065
MF7/1-2i3_3'-Ende : AAAAAAATNNAAAAAAAAAAAAAAAAAATNAAAAA- : 1168

```



---

**Abb. A6** (folgende Seiten): *Alignment* (Matrix Blosum 62) der cDNA-Sequenzen von drei *M. sexta*-Klone (MsMH5/1-1i1, MsMH6/1-8i1 und MsMF7/3-1i2) mit den drei Isoformen (A, B und C) von Annexin IX von *B. mori* (BmANX\_IX-A, -B bzw. -C; *Accession no.* AB030496, AB030497 bzw. AB030498 [Genbank]). **Orange** markiert ist das Startcodon (ATG), **magenta**farben die letzten sechs Basen der jeweils den drei Isoformen von *M. sexta* bzw. *B. mori* gemeinsamen Teilsequenz, **rot** die ersten sechs Basen von Isoform A, **gelb** die ersten sechs Basen der Isoform B und **blau** die ersten sechs Basen der jeweiligen Isoform C. schwarz: 100 % Übereinstimmung der Basen in allen angegebenen Sequenzen, dunkelgrau: < 100 % - 80 % Übereinstimmung, hellgrau: < 80 % - 60 % Übereinstimmung

		*	20	*	40	*	
BmANX_IX-C	:	GGGGATTTT	CGGAATTC	CTCCGT	CTTGTGT	GGTTGGGTGTGTCGCT	GT : 50
BmANX_IX-B	:	GGGGATTTT	CGGAATTC	CTCCGT	CTTGTGT	GGTTGGGTGTGTCGCT	GT : 50
BmANX_IX-A	:	GGGGATTTT	CGGAATTC	CTCCGT	CTTGTGT	GGTTGGGTGTGTCGCT	GT : 50
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	CGGAATTC	GCTCCGT	TACAA	GTGAGGTTGGGTGTGTCGCT	TAA : 41
MsMH5/1-1i1	:	-----	CGGAATTC	GCTCCGT	TACAA	GTGAGGTTGGGTGTGTCGCT	TAA : 41
			cggaattc	ctccg	c	gtg	ggttgggtgtgtcgct
		60	*	80	*	100	
BmANX_IX-C	:	TAAACAAAAGAATCT	--CAAC	ATGAGCGGACAACA	A	TACTACCC	TACAA : 98
BmANX_IX-B	:	TAAACAAAAGAATCT	--CAAC	ATGAGCGGACAACA	A	TACTACCC	TACAA : 98
BmANX_IX-A	:	TAAACAAAAGAATCT	--CAAC	ATGAGCGGACAACA	A	TACTACCC	TACAA : 98
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
MsMF7/3-1i2	:	TTTACAAAAGAATCT	TTCAAC	ATGAGCGGACAACA	G	TACTACCC	CTATAA : 91
MsMH5/1-1i1	:	TTTACAAAAGAATCT	TTCAAC	ATGAGCGGACAACA	G	TACTACCC	CTATAA : 91
		t	acaaaagaatct	caacatgagcgggacaaca	tactaccc	ta	aa
		*	120	*	140	*	
BmANX_IX-C	:	GTGCACCCCCACGGTGT	TACCCCGCGGAGCC	G	TTCGACCCGGC	CGCGGATG	: 148
BmANX_IX-B	:	GTGCACCCCCACGGTGT	TACCCCGCGGAGCC	G	TTCGACCCGGC	CGCGGATG	: 148
BmANX_IX-A	:	GTGCACCCCCACGGTGT	TACCCCGCGGAGCC	G	TTCGACCCGGC	CGCGGATG	: 148
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
MsMF7/3-1i2	:	GTGCACCCCCACGGTGT	TACCCCGCGGAGCC	T	TTCGACCCGGC	CGCGGATG	: 141
MsMH5/1-1i1	:	GTGCACCCCCACGGTGT	TACCCCGCGGAGCC	T	TTCGACCCGGC	CGCGGATG	: 141
		gtgcacccccacggtgt	taccccgcgagcc	ttcgaccc	gc	gcggtatg	
		160	*	180	*	200	
BmANX_IX-C	:	CCGAGACCCT	TCGCAAGGCTAC	GAAGGGCTT	CGCACCGAT	GAGAAGGCT	: 198
BmANX_IX-B	:	CCGAGACCCT	TCGCAAGGCTAC	GAAGGGCTT	CGCACCGAT	GAGAAGGCT	: 198
BmANX_IX-A	:	CCGAGACCCT	TCGCAAGGCTAC	GAAGGGCTT	CGCACCGAT	GAGAAGGCT	: 198
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
MsMF7/3-1i2	:	CGGAGACCCT	CGCAAGGCTAT	GAAAGGGTT	TGGACCGA	CGAGAAGGCC	: 191
MsMH5/1-1i1	:	CGGAGACCCT	CGCAAGGCTAT	GAAAGGGTT	TGGACCGA	CGAGAAGGCC	: 191
		c	gagaccct	cgcaaggcta	gaa	gg	tt
					ggcaccga		gagaaggc
		*	220	*	240	*	
BmANX_IX-C	:	ATCATCGACGT	GCTCTG	CCGCCGCGGC	CATCGT	GCAACGCCT	CGAGATCGC : 248
BmANX_IX-B	:	ATCATCGACGT	GCTCTG	CCGCCGCGGC	CATCGT	GCAACGCCT	CGAGATCGC : 248
BmANX_IX-A	:	ATCATCGACGT	GCTCTG	CCGCCGCGGC	CATCGT	GCAACGCCT	CGAGATCGC : 248
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
MsMF7/3-1i2	:	ATCATCGACGT	CCTTT	CGGCCGCGGGT	TATCGT	CCAGCGTCT	GAGATCGC : 241
MsMH5/1-1i1	:	ATCATCGACGT	CCTTT	CGGCCGCGGGT	TATCGT	CCAGCGTCT	GAGATTGC : 241
		atcatcgacgt	ct	tgccgcccgcgg	atcgt	ca	cg
					ct	gagat	gc
		260	*	280	*	300	
BmANX_IX-C	:	GGAGACC	TTCAAGACTA	ACTATGGCAAGGACT	TGATTAGCGA	ACTCAAGA	: 298
BmANX_IX-B	:	GGAGACC	TTCAAGACTA	ACTATGGCAAGGACT	TGATTAGCGA	ACTCAAGA	: 298
BmANX_IX-A	:	GGAGACC	TTCAAGACTA	ACTATGGCAAGGACT	TGATTAGCGA	ACTCAAGA	: 298
MsMH6/1-8i1	:	-----	-----	-----	-----	-----	12
MsMF7/3-1i2	:	CGAAACT	TTCAAGACTA	ACTATGGCAAGGACT	TCATCAGCGA	AGTTGAAGA	: 291
MsMH5/1-1i1	:	CGAAACT	TTCAAGACTA	ACTATGGCAAGGACT	TCATCAGCGA	AGTTGAAGA	: 291
		ga	ac	ttcaagacta	actatggcaaggac	t	at
					aGCGA	T	AAGA
		*	320	*	340	*	
BmANX_IX-C	:	GTGAACT	CACCGGCA	ACTTGGAA	AAATGTCATCGT	CGCAT	TGATGACTCCC : 348
BmANX_IX-B	:	GTGAACT	CACCGGCA	ACTTGGAA	AAATGTCATCGT	CGCAT	TGATGACTCCC : 348
BmANX_IX-A	:	GTGAACT	CACCGGCA	ACTTGGAA	AAATGTCATCGT	CGCAT	TGATGACTCCC : 348
MsMH6/1-8i1	:	GCGAACT	GAGCGGCA	ACTTGGAG	AACGTCATCGT	TGCGCT	TGATGACCCCC : 62
MsMF7/3-1i2	:	GCGAACT	GAGCGGCA	ACTTGGAG	AACGTCATCGT	TGCGCT	TGATGACCCCC : 341
MsMH5/1-1i1	:	GCGAACT	GAGCGGCA	ACTTGGAG	AACGTCATCGT	TGCGCT	TGATGACCCCC : 341
		G	GAACT	A	CGGCAACTTGGAA	AA	GTCATCGT
					GC	TGATGAC	CCC

		360	*	380	*	400							
BmANX_IX-C	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAGCTCCACGATGCTGTCTCAGGAATTGG	:	398									
BmANX_IX-B	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAGCTCCACGATGCTGTCTCAGGAATTGG	:	398									
BmANX_IX-A	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAGCTCCACGATGCTGTCTCAGGAATTGG	:	398									
MsMH6/1-8i1	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTGCGGGGACTCGG	:	112									
MsMF7/3-1i2	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTGCGGGGACTCGG	:	391									
MsMH5/1-1i1	:	CTGCCCACTTCTACGCTAAGGAACTGCACGACGCCGTGCGGGGACTCGG	:	391									
		CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGA	CT	CACGA	GC	GTC	C	GGA	T	GG		
			*	420	*	440	*						
BmANX_IX-C	:	AACCGACGAAGAAGCCATCATCGAGATCCTGTGCACGCTTTCCAACATATG	:	448									
BmANX_IX-B	:	AACCGACGAAGAAGCCATCATCGAGATCCTGTGCACGCTTTCCAACATATG	:	448									
BmANX_IX-A	:	AACCGACGAAGAAGCCATCATCGAGATCCTGTGCACGCTTTCCAACATATG	:	448									
MsMH6/1-8i1	:	TACCGACGAGGAGGCGGATCATTTGAGATCCTGTGCACACTCTCAAACTACG	:	162									
MsMF7/3-1i2	:	TACCGACGAGGAGGCGGATCATTTGAGATCCTGTGCACACTCTCAAACTACG	:	441									
MsMH5/1-1i1	:	TACCGACGAGGAGGCGGATCATTTGAGATCCTGTGCACACTCTCAAACTACG	:	441									
		ACCGACGA	GA	GC	ATCAT	GAGATCCTGTGCAC	CT	TC	AACTA	G			
		460	*	480	*	500							
BmANX_IX-C	:	GTATCCGTACCATATCCGCATTTTACGAACAACGTGTACGGCAAGAGCCTG	:	498									
BmANX_IX-B	:	GTATCCGTACCATATCCGCATTTTACGAACAACGTGTACGGCAAGAGCCTG	:	498									
BmANX_IX-A	:	GTATCCGTACCATATCCGCATTTTACGAACAACGTGTACGGCAAGAGCCTG	:	498									
MsMH6/1-8i1	:	GCATCCGCACCATCTCAGCTTTTACGAACAATTATACAACAAGAGCCTTG	:	212									
MsMF7/3-1i2	:	GCATCCGCACCATCTCAGCTTTTACGAACAATTATACAACAAGAGCCTTG	:	491									
MsMH5/1-1i1	:	GCATCCGCACCATCTCAGCTTTTACGAACAATTATACAACAAGAGCCTTG	:	491									
		G	ATCCG	ACCAT	TC	GC	TT	TACGAACAA	T	TAC	CAAGAGC	TG	
			*	520	*	540	*						
BmANX_IX-C	:	GAATCGGACTTAAAAGGCGACACGTCGGGACACTTCAAGAGATTGTGCGT	:	548									
BmANX_IX-B	:	GAATCGGACTTAAAAGGCGACACGTCGGGACACTTCAAGAGATTGTGCGT	:	548									
BmANX_IX-A	:	GAATCGGACTTAAAAGGCGACACGTCGGGACACTTCAAGAGATTGTGCGT	:	548									
MsMH6/1-8i1	:	GAATCGGATCTGAAAGGCGACACATCTGGCCACTTCAAGAGGCTGTGTGT	:	262									
MsMF7/3-1i2	:	GAATCGGATCTGAAAGGCGACACATCTGGCCACTTCAAGAGGCTGTGTGT	:	541									
MsMH5/1-1i1	:	GAATCGGATCTGAAAGGCGACACATCTGGCCACTTCAAGAGGCTGTGTGT	:	541									
		GAATCGGA	T	AAAGGCGACAC	TC	GG	CACTTCAAGAG	TGTG	GT				
		560	*	580	*	600							
BmANX_IX-C	:	GTCGTTGTGCATGGCCAATCGCGATGAAAACCAGGGCATCGATGAAGGCT	:	598									
BmANX_IX-B	:	GTCGTTGTGCATGGCCAATCGCGATGAAAACCAGGGCATCGATGAAGGCT	:	598									
BmANX_IX-A	:	GTCGTTGTGCATGGCCAATCGCGATGAAAACCAGGGCATCGATGAAGGCT	:	598									
MsMH6/1-8i1	:	TTCCCTATGTATGGCCAACCGTGATGAAAACCAGGGTGTGGACGAAGGCG	:	312									
MsMF7/3-1i2	:	TTCCCTATGTATGGCCAACCGTGATGAAAACCAGGGTGTGGACGAAGGCG	:	591									
MsMH5/1-1i1	:	TTCCCTATGTATGGCCAACCGTGATGAAAACCAGGGTGTGGACGAAGGCG	:	591									
		TC	T	TG	ATGGCCAA	CG	GATGA	AACCAGGG	T	GA	GAAGGC		
			*	620	*	640	*						
BmANX_IX-C	:	CAGCTAAAGCCGATGCTGAAGCACTGGCCGCCGCTGGTGAAGGTCAATGG	:	648									
BmANX_IX-B	:	CAGCTAAAGCCGATGCTGAAGCACTGGCCGCCGCTGGTGAAGGTCAATGG	:	648									
BmANX_IX-A	:	CAGCTAAAGCCGATGCTGAAGCACTGGCCGCCGCTGGTGAAGGTCAATGG	:	648									
MsMH6/1-8i1	:	CCGCTAGGGCTGACGCTGAGGCCCTGGCCAAACGCCGGCGAGGGACAATGG	:	362									
MsMF7/3-1i2	:	CCGCTAGGGCTGACGCTGAGGCCCTGGCCAAACGCCGGCGAGGGACAATGG	:	641									
MsMH5/1-1i1	:	CCGCTAGGGCTGACGCTGAGGCCCTGGCCAAACGCCGGCGAGGGACAATGG	:	641									
		C	GCTA	GC	GA	GCTGA	GC	CTGGCC	CGC	GG	GA	GG	CAATGG
		660	*	680	*	700							
BmANX_IX-C	:	GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGCTCCTATCA	:	698									
BmANX_IX-B	:	GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGCTCCTATCA	:	698									
BmANX_IX-A	:	GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGCTCCTATCA	:	698									
MsMH6/1-8i1	:	GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTTATCACACGATCCTACCA	:	412									
MsMF7/3-1i2	:	GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTTATCACACGATCCTACCA	:	691									
MsMH5/1-1i1	:	GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTTATCACACGATCCTACCA	:	691									
		GG	ACCGACGA	TC	TCTTCAACTC	AT	CTTATCAC	CG	TCCTA	CA			

		*	720	*	740	*	
BmANX_IX-C	:	G	CAGCTGAGACAGATCTTCGCT	C	GAGTACGAAGCTTTGAC	CGGAAAAGACA	: 748
BmANX_IX-B	:	G	CAGCTGAGACAGATCTTCGCT	C	GAGTACGAAGCTTTGAC	CGGAAAAGACA	: 748
BmANX_IX-A	:	G	CAGCTGAGACAGATCTTCGCT	C	GAGTACGAAGCTTTGAC	CGGAAAAGACA	: 748
MsMH6/1-8i1	:	A	CAGCTGAGACAGATATTTCGCT	T	GAATTCGAGGCGTTGACT	TGAAAAGGACA	: 462
MsMF7/3-1i2	:	A	CAGCTGAGACAGATATTTCGCT	T	GAATTCGAGGCGTTGACT	TGAAAAGGACA	: 741
MsMH5/1-1i1	:	A	CAGCTGAGACAGATATTTCGCT	T	GAATTCGAGGCGTTGACT	TGAAAAGGACA	: 741
			CAGCTGAGACAGAT TTCGCT	GA T	CGA GC	TTGAC GGAAA GACA	
			760	*	780	*	800
BmANX_IX-C	:	T	TGAGGACTCGATCAAGAAA	G	AATTCTCTGGTAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 798
BmANX_IX-B	:	T	TGAGGACTCGATCAAGAAA	G	AATTCTCTGGTAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 798
BmANX_IX-A	:	T	TGAGGACTCGATCAAGAAA	G	AATTCTCTGGTAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 798
MsMH6/1-8i1	:	T	CGAAGAATCTATCAAGAAG	G	AATTCTCTGGAAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 512
MsMF7/3-1i2	:	T	CGAAGAATCTATCAAGAAG	G	AATTCTCTGGAAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 791
MsMH5/1-1i1	:	T	CGAAGAATCTATCAAGAAG	G	AATTCTCTGGAAGCAT	TGAGAAGGGCATG	: 791
			T GA GA TC ATCAAGAA	GAATTCTCTGG	AGCAT	GAGAAGGGCATG	
			*	820	*	840	*
BmANX_IX-C	:	C	TGCTATTGCCAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	C	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 848
BmANX_IX-B	:	C	TGCTATTGCCAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	C	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 848
BmANX_IX-A	:	C	TGCTATTGCCAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	C	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 848
MsMH6/1-8i1	:	C	TTGCTATTGTGAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	T	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 562
MsMF7/3-1i2	:	C	TTGCTATTGTGAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	T	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 841
MsMH5/1-1i1	:	C	TTGCTATTGTGAAATGCGTAAAGAGCAAGGT	T	GGTTTCTTCGCTGAGCG		: 841
			CT GCTATTG AAATGCGTAAAGAGCAAGGT	GGTTTCTTCGCTGAGCG			
			860	*	880	*	900
BmANX_IX-C	:	C	CTGTACTACTCGATGAAGGGGCATCGGCACCAACGACAAGACG	C	TCATCC		: 898
BmANX_IX-B	:	C	CTGTACTACTCGATGAAGGGGCATCGGCACCAACGACAAGACG	C	TCATCC		: 898
BmANX_IX-A	:	C	CTGTACTACTCGATGAAGGGGCATCGGCACCAACGACAAGACG	C	TCATCC		: 898
MsMH6/1-8i1	:	C	CTGTACTATTCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGATAAGACC	C	TCATCA		: 612
MsMF7/3-1i2	:	C	CTGTACTATTCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGATAAGACC	C	TCATCA		: 891
MsMH5/1-1i1	:	C	CTGTACTATTCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGACAAGACC	C	TCATCA		: 891
			CCTGTACTA TC ATGAA GG TCGG AC AA GA AAGAC CTCATC				
			*	920	*	940	*
BmANX_IX-C	:	G	CATCGTGGTGAGCCGCTCCGAGATCGACCT	A	GGGACATCAAGCAGGCA		: 948
BmANX_IX-B	:	G	CATCGTGGTGAGCCGCTCCGAGATCGACCT	A	GGGACATCAAGCAGGCA		: 948
BmANX_IX-A	:	G	CATCGTGGTGAGCCGCTCCGAGATCGACCT	A	GGGACATCAAGCAGGCA		: 948
MsMH6/1-8i1	:	G	AATCGTGGTCAGCCGCTCCGAGATCGACCT	C	GGGACATCAAAACAGGCA		: 662
MsMF7/3-1i2	:	G	AATCGTGGTCAGCCGCTCCGAGATCGACCT	C	GGGACATCAAAACAGGCA		: 941
MsMH5/1-1i1	:	G	AATCGTGGTCAGCCGCTCCGAGATCGACCT	C	GGGACATCAAAACAGGCA		: 941
			G ATCGTGGT AGCCGCTCCGAGATCGACCT	GGGACATCAA CAGGCA			
			960	*	980	*	1000
BmANX_IX-C	:	T	TTCCTCGAGAAGTACGGCAAGT	C	CCTGGAGACCTGGATCGCT	-----	: 990
BmANX_IX-B	:	T	TTCCTCGAGAAGTACGGCAAGT	C	CCTGGAGACCTGGATCGCT	-----	: 990
BmANX_IX-A	:	T	TTCCTCGAGAAGTACGGCAAGT	C	CCTGGAGACCTGGATCGCT	-----	: 990
MsMH6/1-8i1	:	T	TTCCTTGACAAATACGGCAAGC	C	CCTGGAGAGCTGGATCGCT	GTAAAGTTG	: 712
MsMF7/3-1i2	:	T	TTCCTTGACAAATACGGCAAGC	C	CCTGGAGAGCTGGATCGCT	-----	: 983
MsMH5/1-1i1	:	T	TTCCTTGACAAATACGGCAAGC	C	CCTGGAGAGCTGGATCGCT	-----	: 983
			TTCCT GA AA TACGGCAAG CCTGGAGA CTGGATCGCT				
			*	1020	*	1040	*
BmANX_IX-C	:	-----					: -
BmANX_IX-B	:	-----					: -
BmANX_IX-A	:	-----					: -
MsMH6/1-8i1	:	T	CTTGCAATAATCATTCATTCGGCACTTTTCATACGAAAGCGTCACTTGAA				: 762
MsMF7/3-1i2	:	-----					: -
MsMH5/1-1i1	:	-----					: -

	1060	*	1080	*	1100	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	TATGCTTGATTTGCTTCATATGAGAAACGCATTGAAAATTTATCAGTTTA	:		:	812
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1120	*	1140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	GTTTGATGTTGAATTTAAAGTTTCATTGATTATTTACTGTATTTATTGAT	:		:	862
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1160	*	1180	*	1200	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	ATAACCTATTGCATTTTTAATAACTGTCGTCATAATCATTGTGTTTCATA	:		:	912
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1220	*	1240	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	AAATTAACCTCATTTGTCCGTTGTTTGTCTAATGTCTAACAAGCATGTGTA	:		:	962
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1260	*	1280	*	1300	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	TTTCTATGTTTTATATTTAATAGAAATATATAAACTGACCCATACTTCTT	:		:	1012
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1320	*	1340	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	TACGATACACTGTTGTAATTGTGGCTGTGCATTGCCCATACGACACATCA	:		:	1062
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1360	*	1380	*	1400	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
MsMH6/1-8i1	:	CCTATAAAATCTAACCCTCATTATAATATATACTTATTATACAGATCTGT	:		:	1112
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1420	*	1440	*	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	-----		-----		-
MsMH6/1-8i1	:	TTATAGGAATATTCAAGATTTAGTATAAAAGTCAATAATTTTGTGAAGTTA	:			1162
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	1460	*	1480	*	1500	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	-----		-----		-
MsMH6/1-8i1	:	TCAGCAAATGTGTTAATTGTTCTAACAGAGAAAAGCACTAATTGGCATAT	:			1212
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	*	1520	*	1540	*	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	-----		-----		-
MsMH6/1-8i1	:	GTAAAAGGTTTATTTGTCGACAAATGAATACAGTAGTTCAGAATCCGTTT	:			1262
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	1560	*	1580	*	1600	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	-----GATGACACATCCGGAGATTACAAGAAGGCTTTGTTGACCCT	:			1031
MsMH6/1-8i1	:	TGATTGCAGGACGACACTTCCGGGGATTACAAGAAGGCTTTATTGACCCT	:			1312
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	*	1620	*	1640	*	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	TGTCGA-TAAATAAGGT---CCCAGTGTTG---GATGACAACA-----	:			1067
MsMH6/1-8i1	:	AGTCGAATAAATTGTGTGGTTCCCGAATGGTCAGGATCACTATGGTTGAT	:			1362
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	1660	*	1680	*	1700	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	AACCACCTATCTCGAATACTCTAAGTTTAATTTTC-GTTATTTTGTTAGGC	:			1116
MsMH6/1-8i1	:	ATCCACCTATCTCGAATATTTTAAGTTTTTTTTTTGTCAATTTGCTAGAT	:			1412
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

	*	1720	*	1740	*	
BmANX_IX-C	:	-----		-----		-
BmANX_IX-B	:	-----		-----		-
BmANX_IX-A	:	TTTTAAAATTTCCACTAGGAACGTGACACTCGAGGTAACGACTGTACCTA	:			1166
MsMH6/1-8i1	:	TATTAAGA---CAGTTAGGGCTTGACGGCCGA-----	:			1441
MsMF7/3-1i2	:	-----		-----		-
MsMH5/1-1i1	:	-----		-----		-

```

          1760          *          1780          *          1800
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : CTTCTAAATAGGAACTACAACGAAAATAAATATCTCTTTTTTAAAGACA : 1216
MsMH6/1-8i1 : -TCGTAAAGTAA-AACAAGCACACGCTAG-----TCTAGACGTTTC : 1480
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *          1820          *          1840          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : GCGTTCCTTCGGCGTGTCCACGGTTAG-ATCTGATGTACATTTTATTCAT : 1265
MsMH6/1-8i1 : GCGGTCGTCGGGTGTGCTA--GGTTATCGTGAGATGTAAATTTATTT--- : 1525
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          1860          *          1880          *          1900
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : GGAGATCTGTATATTTTGCTTCCTTTATACTCATCAAGGTCACATAACTT : 1315
MsMH6/1-8i1 : -GAGATCTGTATAGTTCGCTTG--TGAGCACGGTCCCGGTCATGTAAGTC : 1572
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *          1920          *          1940          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : TCTCTGCACCG-TAGCTCTAACTGCTTCAGGCGCGCCAGTGCATGTGG-- : 1362
MsMH6/1-8i1 : TTCCGTAGCTAACAGCTTTATGTGTGCGCTCGTGCACGAGGGTAACGGT : 1622
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          1960          *          1980          *          2000
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : -----GA : 992
BmANX_IX-A : ---CCACTAGACGC-CTTAGTTTTACAAGTAGTTCGAATTGTTTTCAGGA : 1408
MsMH6/1-8i1 : TCCTCATTAGTTTTGCTTAGTTTTACAAGTAGTTGTTGGT-TTTTCAGGA : 1671
MsMF7/3-1i2 : -----GA : 985
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *          2020          *          2040          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : CGAAATCGCTGGTCCCCTCGGCGACCTCCTCTCGACAATGTGTTACTAGG : 1042
BmANX_IX-A : CGAAATCGCTGGTCCCCTCGGCGACCTCCTCTCGACAATGTGTTACTAGG : 1458
MsMH6/1-8i1 : GGACATAGGAGGTCCGCTCGGCGAACTCCTATCAACAATGTGTTACTAAA : 1721
MsMF7/3-1i2 : GGACATAGGAGGTCCGCTCGGCGAACTCCTATCAACAATGTGTTACTAAA : 1035
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          2060          *          2080          *          2100
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : CCGCTAGGCGTTAACACCGTATTACCACCGCCATAACTGCAGCGCTGTGT : 1092
BmANX_IX-A : CCGCTAGGCGTTAACACCGTATTACCACCGCCATAACTGCAGCGCTGTGT : 1508
MsMH6/1-8i1 : GC-CTA--CACTGCTATAACATTAACACT-----CAGTATTAC-- : 1756
MsMF7/3-1i2 : GC-CTA--CACTGCTATAACATTAACACT-----CAGTATTAC-- : 1070
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      2120          *      2140          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : GGAGTAATACTGCATTATACACGCATAGTTCACAATTAAGACGGGACTTC : 1142
BmANX_IX-A : GGAGTAATACTGCATTATACACGCATAGTTCACAATTAAGACGGGACTTC : 1558
MsMH6/1-8i1 : -GAGCGCCATTCCGTTATACGC---CAACGCAGTGTCAAG----- : 1792
MsMF7/3-1i2 : -GAGCGCCATTCCGTTATACGC---CAACGCAGTGTCAAG----- : 1106
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          2160          *      2180          *      2200
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TTTGGGATAAATTGTTACGATATATAATATACATGCATTGTGCCCGTTTGA : 1192
BmANX_IX-A : TTTGGGATAAATTGTTACGATATATAATATACATGCATTGTGCCCGTTTGA : 1608
MsMH6/1-8i1 : --TAAAGCAA-----ACTATTTAT---TGCATCTATTGTACCCG----- : 1826
MsMF7/3-1i2 : --TAAAGCAA-----ACTATTTAT---TGCATCTATTGTAAACCG----- : 1140
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      2220          *      2240          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : AGTTCAGTTTAAATTGCAAACCGAATATTTCGAATAATGAGAGTTCTCGGT : 1242
BmANX_IX-A : AGTTCAGTTTAAATTGCAAACCGAATATTTCGAATAATGAGAGTTCTCGGT : 1658
MsMH6/1-8i1 : AGTACA--CTTATGTGCA-----TTTTAAA : 1849
MsMF7/3-1i2 : AGTACA--CTTATGTGCA-----TTTTAAA : 1163
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          2260          *      2280          *      2300
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : CACGTTATATACGCCTTATGTAATCCATTATACTTACGCGTATCGCATTT : 1292
BmANX_IX-A : CACGTTATATACGCCTTATGTAATCCATTATACTTACGCGTATCGCATTT : 1708
MsMH6/1-8i1 : GACATTATATA--ATTAATTTAAGCTATTTAATCATTGTGATTTCCATTC : 1897
MsMF7/3-1i2 : GACATTATATA--ATTAATTTAAGCTATTTAATCATTGTGATTTCCATTC : 1211
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      2320          *      2340          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : GAATATATTGCATAAATGTAAGCTATTTTTGTAAAGATTTATTGTGATCA : 1342
BmANX_IX-A : GAATATATTGCATAAATGTAAGCTATTTTTGTAAAGATTTATTGTGATCA : 1758
MsMH6/1-8i1 : TCATGTATAGTCAGAAC-----CAAGAAT-----G : 1922
MsMF7/3-1i2 : TCATGTATAGTCAGTAC-----CAAGAAT-----G : 1236
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      2360          *      2380          *      2400
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : CACATTACCCCAAGCCGCAGTGTGCACGTCGCGTGTTTGAAACTATGGGC : 1392
BmANX_IX-A : CACATTACCCCAAGCCGCAGTGTGCACGTCGCGTGTTTGAAACTATGGGC : 1808
MsMH6/1-8i1 : CACGTTT-----GAAGTTTGAGCGCAGTG-GTTTGAA-CTATGGGC : 1961
MsMF7/3-1i2 : CACGTTT-----GAAGTTTGAGCGCAGTG-GTTTGAA-CTATGGGC : 1275
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      2420          *      2440          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : CAGTTTTGTTTCCATTGCCGTTTTTGTTCGCTAACTT-TACTGCATAGC : 1441
BmANX_IX-A : CAGTTTTGTTTCCATTGCCGTTTTTGTTCGCTAACTT-TACTGCATAGC : 1857
MsMH6/1-8i1 : CAGTTTA-----TTTTGTTC-GCTAACATGTGAAGCGTGAG : 1996
MsMF7/3-1i2 : CAGTTTA-----TTTTGTTC-GCTAACATGTGAAGCGTGAG : 1310
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```



```

                2460          *          2480          *          2500
BmANX_IX-C : -----GAAGACCTAACGGGTGACTTCAAGCA : 1016
BmANX_IX-B : ATTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGAAGACCTAACGGGTGACTTCAAGCA : 1491
BmANX_IX-A : ATTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGAAGACCTAACGGGTGACTTCAAGCA : 1907
MsMH6/1-8i1 : CGCGTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGATGACCTGACTGGTGACTTCAGGAA : 2046
MsMF7/3-1i2 : CGCGTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGATGACCTGACTGGTGACTTCAGGAA : 1360
MsMH5/1-1i1 : -----GATGACCTGACTGGTGACTTCAGGAA : 1009
                        GA GACCT AC GGTGACTTCA G A

```

```

                *          2520          *          2540          *
BmANX_IX-C : TGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATCCTACAAAAATAATAATTATATC : 1066
BmANX_IX-B : TGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATCCTACAAAAATAATAATTATATC : 1541
BmANX_IX-A : TGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATCCTACAAAAATAATAATTATATC : 1957
MsMH6/1-8i1 : TGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CCCTGCAATAC-----ATTA---- : 2086
MsMF7/3-1i2 : TGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CCCTGCAATAC-----ATTA---- : 1400
MsMH5/1-1i1 : TGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CCCTGCAATAC-----ATTA---- : 1049
                TGTG T GTCAC CT GTGCTTAA CCT CAA A ATTA

```

```

                2560          *          2580          *          2600
BmANX_IX-C : GATTGTTTATTTTATAATATTGTTTGTTCGCGCTTGACGCATGTGAATT : 1116
BmANX_IX-B : GATTGTTTATTTTATAATATTGTTTGTTCGCGCTTGACGCATGTGAATT : 1591
BmANX_IX-A : GATTGTTTATTTTATAATATTGTTTGTTCGCGCTTGACGCATGTGAATT : 2007
MsMH6/1-8i1 : GAGCTGTTATTTTATATGAATATTGTTTAAAGCTTA--GCATGTTG-TT : 2133
MsMF7/3-1i2 : GAGCTGTTATTTTATATGAATATTGTTTAAAGCTTA--GCATGTTG-TT : 1447
MsMH5/1-1i1 : GAGCTGTTATTTTATATGAATATTGTTTAAAGCTTA--GCATGTTG-TT : 1096
                GA TTATTTTATA A T TTT GT GCTT GCATGT TT

```

```

                *          2620          *          2640          *
BmANX_IX-C : ACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAATTTGCAGGACGATACGAAAGGA : 1165
BmANX_IX-B : ACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAATTTGCAGGACGATACGAAAGGA : 1640
BmANX_IX-A : ACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAATTTGCAGGACGATACGAAAGGA : 2056
MsMH6/1-8i1 : GCGGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGC : 2182
MsMF7/3-1i2 : GCGGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGC : 1496
MsMH5/1-1i1 : GCGGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGGTTTGCAGGACGATACGAAGGGC : 1145
                CGG A G TACAAAGTAC AT TTTGCAGGACGATACGAA GG

```

```

                2660          *          2680          *          2700
BmANX_IX-C : GACTTCAAACGCGTGTTACTACCCTTGTTTCGTAAGA--GCATAATAAT : 1213
BmANX_IX-B : GACTTCAAACGCGTGTTACTACCCTTGTTTCGTAAGA--GCATAATAAT : 1688
BmANX_IX-A : GACTTCAAACGCGTGTTACTACCCTTGTTTCGTAAGA--GCATAATAAT : 2104
MsMH6/1-8i1 : GACTTCAAACACGCGTTACTGACCCTAGTGTTCGTAGGGACGCATACGCAT : 2232
MsMF7/3-1i2 : GACTTCAAACACGCGTTACTGACCCTAGTGTTCGTAGGGACGCATACGCAT : 1546
MsMH5/1-1i1 : GACTTCAAACACGCGTTACTGACCCTAGTGTTCGTAGGGACGCATACGCAT : 1195
                GACTTCAAAC CG GTTACT ACCCT GT TCGTA G GCATA AT

```

```

                *          2720          *          2740          *
BmANX_IX-C : AAGACTACAAATGTCTCCAGCAACTGCCTTTTCAATGTGTAAGTGTATG : 1263
BmANX_IX-B : AAGACTACAAATGTCTCCAGCAACTGCCTTTTCAATGTGTAAGTGTATG : 1738
BmANX_IX-A : AAGACTACAAATGTCTCCAGCAACTGCCTTTTCAATGTGTAAGTGTATG : 2154
MsMH6/1-8i1 : TATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCCTTTGACCCGTATAACTGTTAAG : 2279
MsMF7/3-1i2 : TATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCCTTTGAACCGTATAACTGTTAAG : 1593
MsMH5/1-1i1 : TATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCCTTTGAACCGTATAACTGTTAAG : 1242
                A ACT CA A C AG A TGCCTTT a GT TAACTGTTA G

```

```

                2760          *          2780          *          2800
BmANX_IX-C : AGATATGTC TTAGAAATTATAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 1313
BmANX_IX-B : AGATATGTC TTAGAAATTATAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 1788
BmANX_IX-A : AGATATGTC TTAGAAATTATAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 2204
MsMH6/1-8i1 : AGATGT---TTAGAAATTAAAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 2326
MsMF7/3-1i2 : AGATGT---TTAGAAATTAAAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 1640
MsMH5/1-1i1 : AGATGT---TTAGAAATTAAAGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT : 1289
                AGAT T TTAGAAATTA AGCTTGATATTTTGTGAAAATGAGATATT

```

		*	2820	*	2840	*	
BmANX_IX-C	:	TATTGGTGCTGTAGT	TATTGTTTACAATCTACAT	-----	TATATT	TATTAT	: 1358
BmANX_IX-B	:	TATTGGTGCTGTAGT	TATTGTTTACAATCTACAT	-----	TATATT	TATTAT	: 1833
BmANX_IX-A	:	TATTGGTGCTGTAGT	TATTGTTTACAATCTACAT	-----	TATATT	TATTAT	: 2249
MsMH6/1-8i1	:	TATTGGTGCTGTACT	TTTGTGTTACATTATACATATTTACAT	TATAATTAT			: 2376
MsMF7/3-1i2	:	TATTGGTGCTGTACT	TTTGTGTTACATTATACATATTTACAT	TATAATTAT			: 1690
MsMH5/1-1i1	:	TATTGGTGCTGTACT	TTTGTGTTACATTATACATATTTACAT	ATAATTAT			: 1339
		TATTGGTGCTGTA	T TGTGTTACA	T TACAT	AT	T ATTAT	

		2860	*	2880	*	2900	
BmANX_IX-C	:	TGA-TTAAACTCTGT-CTATGTT	CGAAAAA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAA		: 1406
BmANX_IX-B	:	TGA-TTAAACTCTGT-CTATGTT	CGAAAAA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAA		: 1881
BmANX_IX-A	:	TGA-TTAAACTCTGT-CTATGTT	CGAAAAA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAA		: 2297
MsMH6/1-8i1	:	TAAATCACACTATTATGTATGTT	TAAAAAGAG	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAA		: 2426
MsMF7/3-1i2	:	TAAATCACACTATTATGT	TAAAAA	AAAAAAAAAAAA	-----		: 1726
MsMH5/1-1i1	:	TAAATCACACTATTATGT	TATGTT	TAAAAA	AAAAAAAAAAAA	-----	: 1384
		T A T A ACT T	TAtggtt	AAAAaAaAAAAAAAAAAAA			

BmANX_IX-C	:	AAA-----	: 1409
BmANX_IX-B	:	AAA-----	: 1884
BmANX_IX-A	:	AAA-----	: 2300
MsMH6/1-8i1	:	AAAAA	: 2434
MsMF7/3-1i2	:	-----	: -
MsMH5/1-1i1	:	-----	: -

---

**Abb. A7** (folgende Seiten): *Alignment* (Matrix Blosum 62) der cDNA-Sequenzen von drei *M. sexta*-Klonen (MsMH5/1-1i1, MsMH6/1-8i1 und MsMF7/3-1i2 mit den drei Isoformen (A, B und C) von Annexin IX von *B. mori* (BmANX\_IX-A, -B bzw. -C; *Accession no.* siehe Abb. A6) sowie dem Annexin IX-Gen von *B. mori* (BmANX\_IX\_Gen; *Accession no.* AB031208, [Genbank]). **Orange** markiert ist das Startcodon (ATG), magenta die letzten sechs Basen der den jeweiligen drei Isoformen von *M. sexta* bzw. *B. mori* gemeinsamen Teilsequenz, **rot** die ersten sechs Basen der A-Isoform, **gelb** die ersten sechs Basen der Isoform B und **blau** die ersten sechs Basen der jeweiligen Isoform C. schwarz: 100 % Übereinstimmung der Basen in allen angegebenen Sequenzen, dunkelgrau: < 100 % - 80 % Übereinstimmung, hellgrau: < 80 % - 60 % Übereinstimmung

	60	*	80	*	100	
BmANX_IX-C	: TAAACAAAAGAATCT	--	CAACATGAGCGGACAACAATACTACCCCTTACAA	:	98	
BmANX_IX-B	: TAAACAAAAGAATCT	--	CAACATGAGCGGACAACAATACTACCCCTTACAA	:	98	
BmANX_IX-A	: TAAACAAAAGAATCT	--	CAACATGAGCGGACAACAATACTACCCCTTACAA	:	98	
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-		
MsMF7/3-1i2	: TTTACAAAAGAATCTTT	CAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAA	:	91		
MsMH5/1-1i1	: TTTACAAAAGAATCTTT	CAACATGAGCGGACAACAGTACTACCCCTATAA	:	91		

	*	120	*	140	*	
BmANX_IX-C	: GTGCACCCCCACGGTGTACCCCGCGGAGCCGTTTCGACCCGGCCGCGGATG	:	148			
BmANX_IX-B	: GTGCACCCCCACGGTGTACCCCGCGGAGCCGTTTCGACCCGGCCGCGGATG	:	148			
BmANX_IX-A	: GTGCACCCCCACGGTGTACCCCGCGGAGCCGTTTCGACCCGGCCGCGGATG	:	148			
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-		
MsMF7/3-1i2	: GTGCACCCCCACGGTGTACCCCGCGGAGCCGTTTCGACCCGGCCGCGGATG	:	141			
MsMH5/1-1i1	: GTGCACCCCCACGGTGTACCCCGCGGAGCCGTTTCGACCCGGCCGCGGATG	:	141			

	160	*	180	*	200	
BmANX_IX-C	: CCGAGACCCTTCGCAAGGCTACGAAGGGCTTCGGCACCAGATGAGAAGGCT	:	198			
BmANX_IX-B	: CCGAGACCCTTCGCAAGGCTACGAAGGGCTTCGGCACCAGATGAGAAGGCT	:	198			
BmANX_IX-A	: CCGAGACCCTTCGCAAGGCTACGAAGGGCTTCGGCACCAGATGAGAAGGCT	:	198			
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-		
MsMF7/3-1i2	: CGGAGACCCTCCGCAAGGCTATGAAAGGGTTTGGCACCAGACGAGAAGGCC	:	191			
MsMH5/1-1i1	: CGGAGACCCTCCGCAAGGCTATGAAAGGGTTTGGCACCAGACGAGAAGGCC	:	191			

	*	220	*	240	*	
BmANX_IX-C	: ATCATCGACGTGCTCTGCCGCCGCGGCATCGTGCAACGCCTCGAGATCGC	:	248			
BmANX_IX-B	: ATCATCGACGTGCTCTGCCGCCGCGGCATCGTGCAACGCCTCGAGATCGC	:	248			
BmANX_IX-A	: ATCATCGACGTGCTCTGCCGCCGCGGCATCGTGCAACGCCTCGAGATCGC	:	248			
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-		
MsMF7/3-1i2	: ATCATCGACGTCTTTGCCGCCGCGGTATCGTCCAGCGTCTGGAGATCGC	:	241			
MsMH5/1-1i1	: ATCATCGACGTCTTTGCCGCCGCGGTATCGTCCAGCGTCTGGAGATTGC	:	241			

	260	*	280	*	300	
BmANX_IX-C	: GGAGACCTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACTTGATTAGCGAACTCAAGA	:	298			
BmANX_IX-B	: GGAGACCTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACTTGATTAGCGAACTCAAGA	:	298			
BmANX_IX-A	: GGAGACCTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACTTGATTAGCGAACTCAAGA	:	298			
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	12		
MsMF7/3-1i2	: CGAAACTTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATCAGCGAGTTGAAGA	:	291			
MsMH5/1-1i1	: CGAAACTTTCAAGACTAACTATGGCAAGGACCTCATCAGCGAGTTGAAGA	:	291			

gcga t aaga

	*	320	*	340	*	
BmANX_IX-C	: GTGAACCTCACC GGCAACTTGGAAATGTCATCGTCGCATGATGACTCCC	:	348			
BmANX_IX-B	: GTGAACCTCACC GGCAACTTGGAAATGTCATCGTCGCATGATGACTCCC	:	348			
BmANX_IX-A	: GTGAACCTCACC GGCAACTTGGAAATGTCATCGTCGCATGATGACTCCC	:	348			
BmANX_IX_Gen	:	-----	:	-		
MsMH6/1-8i1	: GC GAAC TGAG CGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTGTGGCTGATGACCCC	:	62			
MsMF7/3-1i2	: GC GAAC TGAG CGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTGTGGCTGATGACCCC	:	341			
MsMH5/1-1i1	: GC GAAC TGAG CGGCAACTTGGAGAACGTCATCGTGTGGCTGATGACCCC	:	341			

g gaact a cggcaacttggaa gtcacgt gc tgatgac ccc

		360	*	380	*	400	
BmANX_IX-C	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAG	CTC	CACGATGCTGTCT	CAGGAATTGG	: 398
BmANX_IX-B	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAG	CTC	CACGATGCTGTCT	CAGGAATTGG	: 398
BmANX_IX-A	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAG	CTC	CACGATGCTGTCT	CAGGAATTGG	: 398
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAA	ACTG	CACGACGCCGTCG	CGGGACTCGG	: 112
MsMF7/3-1i2	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAA	ACTG	CACGACGCCGTCG	CGGGACTCGG	: 391
MsMH5/1-1i1	:	CTGCC	CACTTCTACGCTAAGGAA	ACTG	CACGACGCCGTCG	CGGGACTCGG	: 391
		ctgcc	cacttctacgctaagga	ct	cacga gc gtc c	gga t gg	
		*	420	*	440	*	
BmANX_IX-C	:	AACCGACGAA	GAAAGCCATCATC	GAGATCCTGTGCAC	GCTTTC	CAACTATG	: 448
BmANX_IX-B	:	AACCGACGAA	GAAAGCCATCATC	GAGATCCTGTGCAC	GCTTTC	CAACTATG	: 448
BmANX_IX-A	:	AACCGACGAA	GAAAGCCATCATC	GAGATCCTGTGCAC	GCTTTC	CAACTATG	: 448
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	TACCGACGAG	GAGGCGATCATT	GAGATCCTGTGCAC	ACTCTC	AAACTACG	: 162
MsMF7/3-1i2	:	TACCGACGAG	GAGGCGATCATT	GAGATCCTGTGCAC	ACTCTC	AAACTACG	: 441
MsMH5/1-1i1	:	TACCGACGAG	GAGGCGATCATT	GAGATCCTGTGCAC	ACTCTC	AAACTACG	: 441
		accgacga	ga gc atcat	gagatcctgtgcac	ct tc	aacta g	
		460	*	480	*	500	
BmANX_IX-C	:	GTATCCGT	TACCATATCCGC	ATTTTACGAACA	ACTGTACGG	CAAGAGCCTG	: 498
BmANX_IX-B	:	GTATCCGT	TACCATATCCGC	ATTTTACGAACA	ACTGTACGG	CAAGAGCCTG	: 498
BmANX_IX-A	:	GTATCCGT	TACCATATCCGC	ATTTTACGAACA	ACTGTACGG	CAAGAGCCTG	: 498
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	GCATCCG	CACCATCTCAGCT	TTTCTACGAACA	ATTATACA	ACAAGAGCTTG	: 212
MsMF7/3-1i2	:	GCATCCG	CACCATCTCAGCT	TTTCTACGAACA	ATTATACA	ACAAGAGCTTG	: 491
MsMH5/1-1i1	:	GCATCCG	CACCATCTCAGCT	TTTCTACGAACA	ATTATACA	ACAAGAGCTTG	: 491
		g atccg	accat tc gc tt	tacgaacaa t	tac	caagagc tg	
		*	520	*	540	*	
BmANX_IX-C	:	GAATCGGACT	TAAAAGGCGACAC	GTCGGGA	CACCTTCAAGAGAT	TGTGCGT	: 548
BmANX_IX-B	:	GAATCGGACT	TAAAAGGCGACAC	GTCGGGA	CACCTTCAAGAGAT	TGTGCGT	: 548
BmANX_IX-A	:	GAATCGGACT	TAAAAGGCGACAC	GTCGGGA	CACCTTCAAGAGAT	TGTGCGT	: 548
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	GAATCGGATCT	GAAAGGCGACAC	ATCTGGC	CACCTTCAAGAGGC	TGTGTGT	: 262
MsMF7/3-1i2	:	GAATCGGATCT	GAAAGGCGACAC	ATCTGGC	CACCTTCAAGAGGC	TGTGTGT	: 541
MsMH5/1-1i1	:	GAATCGGATCT	GAAAGGCGACAC	ATCTGGC	CACCTTCAAGAGGC	TGTGTGT	: 541
		gaatcgga	t aaaggcgacac	tc gg	cacttcaagag	tgtg gt	
		560	*	580	*	600	
BmANX_IX-C	:	GTCGTTGTGC	ATGGCCAATCGC	GATGAAAACCAGGG	CATCGAT	GAAGGCT	: 598
BmANX_IX-B	:	GTCGTTGTGC	ATGGCCAATCGC	GATGAAAACCAGGG	CATCGAT	GAAGGCT	: 598
BmANX_IX-A	:	GTCGTTGTGC	ATGGCCAATCGC	GATGAAAACCAGGG	CATCGAT	GAAGGCT	: 598
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	TTCCCTATGT	ATGGCCAACCGT	GATGAGAACCAGGG	TGTGGAC	GAAGGCG	: 312
MsMF7/3-1i2	:	TTCCCTATGT	ATGGCCAACCGT	GATGAGAACCAGGG	TGTGGAC	GAAGGCG	: 591
MsMH5/1-1i1	:	TTCCCTATGT	ATGGCCAACCGT	GATGAGAACCAGGG	TGTGGAC	GAAGGCG	: 591
		tc t tg	atggccaa cg	gatga aaccaggg	t ga	gaaggc	
		*	620	*	640	*	
BmANX_IX-C	:	CAGCTAAAGCC	GATGCTGAAGCA	CTGGCCGCCG	GCTGGT	GAAGGTCAATGG	: 648
BmANX_IX-B	:	CAGCTAAAGCC	GATGCTGAAGCA	CTGGCCGCCG	GCTGGT	GAAGGTCAATGG	: 648
BmANX_IX-A	:	CAGCTAAAGCC	GATGCTGAAGCA	CTGGCCGCCG	GCTGGT	GAAGGTCAATGG	: 648
BmANX_IX_Gen	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
MsMH6/1-8i1	:	CCGCTAGGGCT	GACGCTGAGGCC	CTGGCCAACGCC	GGCGAGGGG	ACAATGG	: 362
MsMF7/3-1i2	:	CCGCTAGGGCT	GACGCTGAGGCC	CTGGCCAACGCC	GGCGAGGGG	ACAATGG	: 641
MsMH5/1-1i1	:	CCGCTAGGGCT	GACGCTGAGGCC	CTGGCCAACGCC	GGCGAGGGG	ACAATGG	: 641
		c gcta	gc ga gctga gc	ctggcc cgc	gg ga gg	caatgg	

	660	*	680	*	700	
BmANX_IX-C	: GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGGTCCTATCA	:	698			
BmANX_IX-B	: GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGGTCCTATCA	:	698			
BmANX_IX-A	: GGAACCGACGAATCAATCTTCAACTCCATCCTTATCACTCGGTCCTATCA	:	698			
BmANX_IX_Gen	: -----CAACTCCATCCTTATCACTCGGTCCTATCA	:	30			
MsMH6/1-8i1	: GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTTATCACACGATCCTACCA	:	412			
MsMF7/3-1i2	: GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTTATCACACGATCCTACCA	:	691			
MsMH5/1-1i1	: GGCACCGACGAGTCCGTCTTCAACTCTATTCTCATCACACGATCCTACCA	:	691			
	gg accgacga tc tcttCAACTC AT CTtATCAC CG TCCTA CA					

	*	720	*	740	*	
BmANX_IX-C	: GCAGCTGAGACAG-----	:	711			
BmANX_IX-B	: GCAGCTGAGACAG-----	:	711			
BmANX_IX-A	: GCAGCTGAGACAG-----	:	711			
BmANX_IX_Gen	: GCAGCTGAGACAGGTGAGATAAAAAACATTCCTAGCACAAACTTTTTTTTG	:	80			
MsMH6/1-8i1	: ACAGCTGAGACAG-----	:	425			
MsMF7/3-1i2	: ACAGCTGAGACAG-----	:	704			
MsMH5/1-1i1	: ACAGCTGAGACAG-----	:	704			
	CAGCTGAGACAG					

	760	*	780	*	800	
BmANX_IX-C	: -----	:	-			
BmANX_IX-B	: -----	:	-			
BmANX_IX-A	: -----	:	-			
BmANX_IX_Gen	: CTATTATTTAGCAGAACTTCTTCATGTCTTTCCCTCATTACTGAGGATCG	:	130			
MsMH6/1-8i1	: -----	:	-			
MsMF7/3-1i2	: -----	:	-			
MsMH5/1-1i1	: -----	:	-			

	*	820	*	840	*	
BmANX_IX-C	: -----	:	-			
BmANX_IX-B	: -----	:	-			
BmANX_IX-A	: -----	:	-			
BmANX_IX_Gen	: ACCCACTTCGATTAAGCGGCACGACACGAGAACCCCTCTCGTCGTGACCGC	:	180			
MsMH6/1-8i1	: -----	:	-			
MsMF7/3-1i2	: -----	:	-			
MsMH5/1-1i1	: -----	:	-			

	860	*	880	*	900	
BmANX_IX-C	: -----	:	-			
BmANX_IX-B	: -----	:	-			
BmANX_IX-A	: -----	:	-			
BmANX_IX_Gen	: CGGTAACCTACATTTCCCGATCCTGCGGACAGTATGGAAACCAGTCGACGTC	:	230			
MsMH6/1-8i1	: -----	:	-			
MsMF7/3-1i2	: -----	:	-			
MsMH5/1-1i1	: -----	:	-			

	*	920	*	940	*	
BmANX_IX-C	: -----	:	-			
BmANX_IX-B	: -----	:	-			
BmANX_IX-A	: -----	:	-			
BmANX_IX_Gen	: GCCCCAAACACGTCATTTCCGATCCTCCCGATCCACTAACGGTGCTTTTA	:	280			
MsMH6/1-8i1	: -----	:	-			
MsMF7/3-1i2	: -----	:	-			
MsMH5/1-1i1	: -----	:	-			

	960	*	980	*	1000	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GGTACCTCAAGCACCGGTCATCGTTCTCGTCGAACCCGTCGCTTGCGACG	:			330
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1020	*	1040	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	AAGGGCTCGACGAGTAAATTAACCTCTCAGACACAGCCCACTGAGTTTCTT	:			380
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1060	*	1080	*	1100	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GCCGGATCTTCTCAGTGGGTCGCGTTTCCAATCCGGTGATAGATTCTGCG	:			430
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1120	*	1140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	AAGACAGCTCTTGCTAGGGTTCGTGTTAGCAACGTCGTCGGGTTTGAGCC	:			480
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1160	*	1180	*	1200	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CCGTGAGCTCACCTACTAGTTAAGGCTACGCTGATATAGCCTCTCAAGGC	:			530
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1220	*	1240	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TCTCAGCTTAGGTAGATAAAAAACGACCACACGTATGCTAGTATTTCCA	:			580
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1260	*	1280	*	1300	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TGAATACCGGTCCGCTGGGAGGTGGACTGCCTAATGGGTGCTGCCTCCAA	:			630
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1320	*	1340	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CTGCTCTGCTCTCATTGCAGTTGACCATCTCGTTGACGCCTTTCCTTTGG	:			680
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1360	*	1380	*	1400	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CTCGTTTGCCCTCAACCTGACTAAGAATGATAAGCTTTTTCAAACCTATCG	:			730
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1420	*	1440	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CCGCACAGAAGTAAAGTTATTCGTTACGTGACCGTGGTAGATTTGTGATT	:			780
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1460	*	1480	*	1500	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	AGGTATATTAAGTACCAGAATTTGACCGACATAGTATTCAGTCATGATTT	:			830
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1520	*	1540	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TTGAAGGCAAATGACGTCATCCAGAGGAGTGTCGTATTCGTATGCGATGA	:			880
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-



	1560	*	1580	*	1600	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	CTTAAGTAAGTATATCAACATTGATAATCAAGCCGACACATGACTAACAA	:		:	930
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1620	*	1640	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AATAGGATATAGGATATAGTATATTTTATGTATCATCAACTATCATAAAA	:		:	980
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1660	*	1680	*	1700	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TTCGCAAATATAGCAATTATTTATAGTACTCAAAATTCGACCTTCGCAAT	:		:	1030
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1720	*	1740	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	ATACTTGAATGCTAACCGTTGCGAATTTTAAAACTGCGTTTACAAGGAA	:		:	1080
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1760	*	1780	*	1800	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AATGTTTTCTATCGTACGTACACTTTTATTCTCACGTATACTTCAAAGTC	:		:	1130
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	1820	*	1840	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	ACGCTTTCTTTAATGCTTACAAAACGAATTATTAAATTGACATTCATTCA	:		:	1180
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	1860	*	1880	*	1900	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CATATAATACAATTTTATGAAAAATAATGGACGGAATTCCAGCTATAC	:			1230
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	1920	*	1940	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CTATCAGTGGTTGTTAAACTTTTGCACCCGCGATCTTGGCTTGGGCAAAC	:			1280
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	1960	*	1980	*	2000	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CCAACTACTTTTATCGCTTCGTTACTGAAGAAACCCACGTTAACAGAAC	:			1330
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	2020	*	2040	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	ATTGTCTCCGTTTCGAGATATGGCCCTAAATGATAACCCAGAATCGCCCTC	:			1380
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	2060	*	2080	*	2100	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TACTGAAACAGCAGATGCAAGTAGCCACACACGGGGTATTATTATCGGT	:			1430
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	2120	*	2140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	ATACTTTTATATCATTGATGAATTTAAAAAAAATACGCATGCATTATAA	:			1480
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

```

                2160          *          2180          *          2200
BmANX_IX-C      : ----- : -
BmANX_IX-B      : ----- : -
BmANX_IX-A      : ----- : -
BmANX_IX_Gen    : ATATGTAAATACATCGTTATAATTTGCTATGAACTCATTACGATCGTGAC : 1530
MsMH6/1-8i1    : ----- : -
MsMF7/3-1i2    : ----- : -
MsMH5/1-1i1    : ----- : -

```

```

                *          2220          *          2240          *
BmANX_IX-C      : ----- : -
BmANX_IX-B      : ----- : -
BmANX_IX-A      : ----- : -
BmANX_IX_Gen    : GTCACATTCCGGTAACGAATCTTCATTGGAAATAATTGGCGGCGGTGGAGG : 1580
MsMH6/1-8i1    : ----- : -
MsMF7/3-1i2    : ----- : -
MsMH5/1-1i1    : ----- : -

```

```

                2260          *          2280          *          2300
BmANX_IX-C      : -----AT : 713
BmANX_IX-B      : -----AT : 713
BmANX_IX-A      : -----AT : 713
BmANX_IX_Gen    : CACTTATACGCGTGCATTGTTAATGGTTGACTTTACCGTGTATTGCAGAT : 1630
MsMH6/1-8i1    : -----AT : 427
MsMF7/3-1i2    : -----AT : 706
MsMH5/1-1i1    : -----AT : 706

```

AT

```

                *          2320          *          2340          *
BmANX_IX-C      : CTTGCGCGAGTACGAAGCTTTGACCGGAAAAGACATTGAGGACTCGATCA : 763
BmANX_IX-B      : CTTGCGCGAGTACGAAGCTTTGACCGGAAAAGACATTGAGGACTCGATCA : 763
BmANX_IX-A      : CTTGCGCGAGTACGAAGCTTTGACCGGAAAAGACATTGAGGACTCGATCA : 763
BmANX_IX_Gen    : CTTGCGCGAGTACGAAGCTTTGACCGGAAAAGACATTGAGGACTCGATCA : 1680
MsMH6/1-8i1    : ATTGCGCTGAATTCGAGGCGTTGACTGGAAAAGGACATCGAAGAATCTATCA : 477
MsMF7/3-1i2    : ATTGCGCTGAATTCGAGGCGTTGACTGGAAAAGGACATCGAAGAATCTATCA : 756
MsMH5/1-1i1    : ATTGCGCTGAATTCGAGGCGTTGACTGGAAAAGGACATCGAAGAATCTATCA : 756

```

TTGCGC GA T CGA GC TTGAC GGAAA GACAT GA GA TC ATCA

```

                2360          *          2380          *          2400
BmANX_IX-C      : AGAAAGAATTCTCTGGTAGCATTGAGAAGGGCATGCTCGCTATTG----- : 808
BmANX_IX-B      : AGAAAGAATTCTCTGGTAGCATTGAGAAGGGCATGCTCGCTATTG----- : 808
BmANX_IX-A      : AGAAAGAATTCTCTGGTAGCATTGAGAAGGGCATGCTCGCTATTG----- : 808
BmANX_IX_Gen    : AGAAAGAATTCTCTGGTAGCATTGAGAAGGGCATGCTCGCTATTGTAAG : 1730
MsMH6/1-8i1    : AGAAGGAATTCTCTGGAAGCATCGAGAAGGGCATGCTTGCTATTG----- : 522
MsMF7/3-1i2    : AGAAGGAATTCTCTGGAAGCATCGAGAAGGGCATGCTTGCTATTG----- : 801
MsMH5/1-1i1    : AGAAGGAATTCTCTGGAAGCATCGAGAAGGGCATGCTTGCTATTG----- : 801

```

AGAA GAATTCTCTGG AGCAT GAGAAGGGCATGCT GCTATTG

```

                *          2420          *          2440          *
BmANX_IX-C      : ----- : -
BmANX_IX-B      : ----- : -
BmANX_IX-A      : ----- : -
BmANX_IX_Gen    : TTTGATTAACTTAAAAGATATATTTTCGTTGTGGCTTAAAGGATAAGATG : 1780
MsMH6/1-8i1    : ----- : -
MsMF7/3-1i2    : ----- : -
MsMH5/1-1i1    : ----- : -

```

	2460	*	2480	*	2500	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TCCGGTGCATTCGTATCTCTAGCTATGCATCTGTGTTCAAATCCTGCTGG	:			1830
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	2520	*	2540	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CAAATACCAATTTTTGTAATAAAATACGTACCTACTTGACAAATGTTCTC	:			1880
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	2560	*	2580	*	2600	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GATTGAGTTCCACGGTGAAGGAATAACATCGTGTGATAAAAAATCAAACCC	:			1930
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	2620	*	2640	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GTAAAATTATAATTTGCGTAATTACTGGTGGTAGGACCTCTTGTGAGTCC	:			1980
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	2660	*	2680	*	2700	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GCGCGGGTAGGTACCACCACCAGAAAGCAGTAATGCGTTTCGGTTTGAAG	:			2030
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	2720	*	2740	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GGTGGGGCAGCCGTTGTAACTATACTTGAGACCTTAGAACTTAATCTCAA	:			2080
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	2760	*	2780	*	2800	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	GGTGGGTGGCGCATTTACGTTGTAGATGTCTATGGGTTCCAGTAACCACT	:		:	2130
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	2820	*	2840	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TAACACCAAACGGGCTGTGAGCTCGTCCAAGCATCTAAGCAATAAATAAA	:		:	2180
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	2860	*	2880	*	2900	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TAAAAATCTGAAAGCCATTTTGTATTAATGTTTATACACTCCAATAGGTA	:		:	2230
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	2920	*	2940	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	ATCACTGTACATTAATTATGACTATATTTCAACTATGTACGGTATAAGTG	:		:	2280
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	2960	*	2980	*	3000	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TACCTATTTCTTCAAAACCAAATAATATCAACTTAATAATGCTACAAGTG	:		:	2330
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	3020	*	3040	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TATTTACATAGTTGTGTAGTTCAGGCTCCAATGAAATCTTTTTTTTTTTTT	:		:	2380
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	3060	*	3080	*	3100	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GCAATATTTTCCAATGGCTTTGTTGACCTAGTTGTATGGGACGTTTTTCCT	:			2430
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	3120	*	3140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	TAGAAGTTTTAATTAAAAATAAACATTATGATAGGTACGTTATTTAAAA	:			2480
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	3160	*	3180	*	3200	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	CCTATGACAAATGAAATTTTCCTATAACATTATTCGATACGTCATATTTT	:			2530
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	3220	*	3240	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	AAAAGATTAAGATTTTCGGTGTGTGCTATGAAAAAGTTTACCTCTAAAGAA	:			2580
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	3260	*	3280	*	3300	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	ATACTTCCAAATTAGGTTTACAGAGATGATTTGATAGATACTTGCGTTGG	:			2630
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	*	3320	*	3340	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:			-
BmANX_IX-B	:	-----	:			-
BmANX_IX-A	:	-----	:			-
BmANX_IX_Gen	:	GGAATGGTTCGCTCGCGATTTCCCTTAAAGTAAAAAATTTTAAATAGCAA	:			2680
MsMH6/1-8i1	:	-----	:			-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:			-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:			-

	3360	*	3380	*	3400	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AAATTTTCATTTATTTTTTATATTGATTATTCTTGGTCTACTACTACGAG	:		:	2730
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	3420	*	3440	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TATTAACAAATTAATTCTATTAAATCTATCTCTCACTTACGCACAATG	:		:	2780
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	3460	*	3480	*	3500	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AGACAGAAAATTGATTAAATACATGTAAATGTGTATGTGATAAAATCATG	:		:	2830
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	3520	*	3540	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TAAATTGTGCGGTGTGATGCAGTTAGATATCGTTGCACTTGTTAGTGTA	:		:	2880
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	3560	*	3580	*	3600	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TTGAATGCGTAGACATTTTAGGACATTCTAGAGTACCTATAAGCATTATT	:		:	2930
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	3620	*	3640	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AGTCCGCGTCACGGACGAGGTATAGAAGGAAAATCGCGACCTGCGTCAGT	:		:	2980
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	3660	*	3680	*	3700	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	CTCACTTTGTCACTACAGTCAATCATGTAGCGGATGTCTTACTAGGCATT	:		:	3030
MsMH6/1-8i1	:	-----	:	-----	:	-
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

```

          *          3720          *          3740          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : ----- : -
BmANX_IX_Gen : TCATTGCTTGCATGGCGATCGTTATCATCGTGATGACTGTTGCTTCTCGA : 3080
MsMH6/1-8i1 : ----- : -
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          3760          *          3780          *          3800
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : ----- : -
BmANX_IX-A : ----- : -
BmANX_IX_Gen : TGATTTATAAAAAAGTAAGGGTAGCTTACGTATAGGGATATCGATTGTAG : 3130
MsMH6/1-8i1 : ----- : -
MsMF7/3-1i2 : ----- : -
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *          3820          *          3840          *
BmANX_IX-C : CCAAATGCGTAAAGAGCAAGGTCGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAC : 858
BmANX_IX-B : CCAAATGCGTAAAGAGCAAGGTCGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAC : 858
BmANX_IX-A : CCAAATGCGTAAAGAGCAAGGTCGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAC : 858
BmANX_IX_Gen : CCAAATGCGTAAAGAGCAAGGTCGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAC : 3180
MsMH6/1-8i1 : TGAAATGCGTAAAGAGCAAGGTTGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAT : 572
MsMF7/3-1i2 : TGAAATGCGTAAAGAGCAAGGTTGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAT : 851
MsMH5/1-1i1 : TGAAATGCGTAAAGAGCAAGGTTGGTTTCTTCGCTGAGCGCCTGTACTAT : 851
          AAATGCGTAAAGAGCAAGGT GGTTCCTTCGCTGAGCGCCTGTACTA

```

```

          3860          *          3880          *          3900
BmANX_IX-C : TCGATGAAGGGCATCGGCACCAACGACAAGACGCTCATCCGCATCGTGGT : 908
BmANX_IX-B : TCGATGAAGGGCATCGGCACCAACGACAAGACGCTCATCCGCATCGTGGT : 908
BmANX_IX-A : TCGATGAAGGGCATCGGCACCAACGACAAGACGCTCATCCGCATCGTGGT : 908
BmANX_IX_Gen : TCGATGAAGGGCATCGGCACCAACGACAAGACGCTCATCCGCATCGTGGT : 3230
MsMH6/1-8i1 : TCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGATAAGACCCTCATCAGAATCGTGGT : 622
MsMF7/3-1i2 : TCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGATAAGACCCTCATCAGAATCGTGGT : 901
MsMH5/1-1i1 : TCCATGAAAGGGCTCGGTACAAATGACAAGACCCTCATCAGAATCGTGGT : 901
          TC ATGAA GG TCGG AC AA GA AAGAC CTCATC G ATCGTGGT

```

```

          *          3920          *          3940          *
BmANX_IX-C : GAGCCGCTCCGAGATCGACCTAGGGGACATCAAGCAGGCATTCCCTCGAGA : 958
BmANX_IX-B : GAGCCGCTCCGAGATCGACCTAGGGGACATCAAGCAGGCATTCCCTCGAGA : 958
BmANX_IX-A : GAGCCGCTCCGAGATCGACCTAGGGGACATCAAGCAGGCATTCCCTCGAGA : 958
BmANX_IX_Gen : GAGCCGCTCCGAGATCGACCTAGGGGACATCAAGCAGGCATTCCCTCGAGA : 3280
MsMH6/1-8i1 : CAGCCGCTCCGAGATCGACCTCGGGGACATCAAAACAGGCATTCCCTTGACA : 672
MsMF7/3-1i2 : CAGCCGCTCCGAGATCGACCTCGGGGACATCAAAACAGGCATTCCCTTGACA : 951
MsMH5/1-1i1 : CAGCCGCTCCGAGATCGACCTCGGGGACATCAAAACAGGCATTCCCTTGACA : 951
          AGCCGCTCCGAGATCGACCT GGGGACATCAA CAGGCATTCCCT GA A

```

```

          3960          *          3980          *          4000
BmANX_IX-C : AGTACGGCAAGTCCCTGGAGACCTGGATCGCT----- : 990
BmANX_IX-B : AGTACGGCAAGTCCCTGGAGACCTGGATCGCT----- : 990
BmANX_IX-A : AGTACGGCAAGTCCCTGGAGACCTGGATCGCT----- : 990
BmANX_IX_Gen : AGTACGGCAAGTCCCTGGAGACCTGGATCGCTGTAAGTGTTGTCCCTCTT : 3330
MsMH6/1-8i1 : AATACGGCAAGCCCCCTGGAGAGCTGGATCGCTGTAAGTGTTGTCAATA : 722
MsMF7/3-1i2 : AATACGGCAAGCCCCCTGGAGAGCTGGATCGCT----- : 983
MsMH5/1-1i1 : AATACGGCAAGCCCCCTGGAGAGCTGGATCGCT----- : 983
          A TACGGCAAG CCCTGGAGA CTGGATCGCT

```



	*	4020	*	4040	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	GTC-TACACCTGACTCTGAGATGTACCTTGAGCTTTGTTATCATTCTGTC	:		:	3379
MsMH6/1-8i1	:	ATCATTTCATTTCGGCACTTTTCATA---CGAAAGCGTCACTTGAATATGCTT	:		:	769
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4060	*	4080	*	4100	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TACATGTGTTTTATGTGGGTCAAGGCAAATACTGATCTGTTTTATTTGAA	:		:	3429
MsMH6/1-8i1	:	GATTTGCTTCATATGAGAAACGCATTGAAAATTTATCAGTTTAGTTTGAT	:		:	819
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4120	*	4140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	AT--ATTTCAAACCTTATAACTACAGATTAACAAACACGAATCACGAATC	:		:	3477
MsMH6/1-8i1	:	GTTGAATTTAAAGTTTC--ATTGATTATTTACTGTATTTATTGATATAAC	:		:	867
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4160	*	4180	*	4200	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	CATTTTAGTTCCCACCACCTCAACCCCCTCTCCAATGTTTTGTGTTGTTT	:		:	3527
MsMH6/1-8i1	:	CTATTGCATTTTTTAATAACTGTGCTCCATAATCATTGTGTTTCATAAAATT	:		:	917
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4220	*	4240	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	GACTAATCGCATGATATAGTACACGTACAGATTTTATTATAATATTTCAA	:		:	3577
MsMH6/1-8i1	:	AACTCATTTGTC--CGTTGTTTGTCTA-ATGTCTAACAAGCATGTGTATT	:		:	964
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4260	*	4280	*	4300	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX_Gen	:	TATGTATTTTATGAAATAACACTGCCCCATATCTTCGAAGACTGTAACAT	:		:	3627
MsMH6/1-8i1	:	TCTATGTTTTAT-ATTTAATAGAA----ATATATAAACTGACCCATACTT	:		:	1009
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4320	*	4340	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:		:	-
BmANX_IX_Gen	:	ATTTA-GGTACG-TGCT-TAGCTGGCACTATGTACTCTCATTGAAACATG	:		:	3674
MsMH6/1-8i1	:	CTTTACGATACACTGTTGTAATTGTGGCTGTGCATTGCCCATACGACACA	:		:	1059
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	4360	*	4380	*	4400	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:		:	-
BmANX_IX_Gen	:	TTTCGCTCATTACATTACATTTTCATCGTAATCGACTATTTATTTATA	:		:	3724
MsMH6/1-8i1	:	T--CACCTAT--AAAATCTAACCCTCATTATAATATA-TACTTATT-ATA	:		:	1103
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	*	4420	*	4440	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:		:	-
BmANX_IX_Gen	:	CAGATCTGAATAGATTAGACAAATCCGACCGAAAATACAGCAATACTTGT	:		:	3774
MsMH6/1-8i1	:	CAGATCTGTTTA---TAGGAATATTCAA---GATTTAGTATAAAGTCAAT	:		:	1147
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	4460	*	4480	*	4500	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:		:	-
BmANX_IX_Gen	:	GGTTTTTAATATTTTATATGAAATTTGTGCTTATGGATTTCTTTCTATCC	:		:	3824
MsMH6/1-8i1	:	AATTTTGTGAAGTTATCAGCAAAT--GTGTTAATTG-----TTCTAACA	:		:	1189
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	*	4520	*	4540	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----	:		:	-
BmANX_IX_Gen	:	GGCAAAAATACTAATTGGAGTATATCGT--GTTAACGTATCGATAAAT--	:		:	3870
MsMH6/1-8i1	:	GAGAAAAGCACTAATTGGCATATGTAAAAGGTTTATTTGTGACAAATGA	:		:	1239
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	4560	*	4580	*	4600	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	-----GATGACACATCCGGAGAT	:		:	1008
BmANX_IX_Gen	:	-CGCAGGAGCTGTGAATCCGTTTTGATTGCAGGATGACACATCCGGAGAT	:		:	3919
MsMH6/1-8i1	:	ATACAGTAGTTTCAGAAATCCGTTTTGATTGCAGGACGACACTTCCGGGGAT	:		:	1289
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	*	4620	*	4640	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	TACAAGAAGGCTTTGTTGACCCTTGTCGA-TAAATAAGGT----	:	CCCGAG	:	1053
BmANX_IX_Gen	:	TACAAGAAGGCTTTGTTGACCCTTGTCGA-TAAATAAGGT----	:	CCCGAG	:	3964
MsMH6/1-8i1	:	TACAAGAAGGCTTTATTGACCCTAGTCGAATAAATTGTGTGGTTCCCGAA	:		:	1339
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4660	*	4680	*	4700	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	TGGG---GATGACAACA-----	:	AACCACCTATCTCGAATACTCTAAGTT	:	1094
BmANX_IX_Gen	:	TGGG---GATGACAACA-----	:	AACCACCTATCTCGAATACTCTAAGTT	:	4005
MsMH6/1-8i1	:	TGGTCAGGATCACTATGGTTGATATCCACCTATCTCGAATATTTTAAGTT	:		:	1389
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4720	*	4740	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	TAATTTTC-GTTATTTTGTAGGCTTTTAAATTTCCACTAGGAACGTGAC	:		:	1143
BmANX_IX_Gen	:	TAATTTTC-GTTATTTTGTAGGCTTTTAAATTTCCACTAGGAACGTGAC	:		:	4054
MsMH6/1-8i1	:	TTTTTTTTGTCAATTTGCTAGATTATTAAGA----	:	CAGTTAGGGCTTGAC	:	1435
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4760	*	4780	*	4800	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	ACTCGAGGTAACGACTGTACCTACTTCTAAAATAGGAACTACAACGAAAA	:		:	1193
BmANX_IX_Gen	:	ACTCGAGGTAACGACTGTACCTACTTCTAAAATAGGAACTACAACGAAAA	:		:	4104
MsMH6/1-8i1	:	GGCCGA-----	:	TCGTAAAGTAA-AACAAGCACACGC	:	1466
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4820	*	4840	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	TAAATATCTCTTTTTTAAAGACAGCGTTCCCTCGGCGTGTACCCGGTTAG	:		:	1243
BmANX_IX_Gen	:	TAAATATCTCTTTTTTAAAGACAGCGTTCCCTCGGCGTGTACCCGGTTAG	:		:	4154
MsMH6/1-8i1	:	TAG-----	:	TCTAGACGTTTCGCGGTGTCGGGTGTGCTA--GGTTAT	:	1505
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	4860	*	4880	*	4900	
BmANX_IX-C	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:	-----	:	-
BmANX_IX-A	:	-ATCTGATGTACATTTTATTCATGGAGATCTGTATATTTTGCTTCCTTTA	:		:	1292
BmANX_IX_Gen	:	-ATCTGATGTACATTTTATTCATGGAGATCTGTATATTTTGCTTCCTTTA	:		:	4203
MsMH6/1-8i1	:	CGTGAGATGTAAATTTATTT--	:	GAGATCTGTATAGTTCGCTTG--TGAG	:	1550
MsMF7/3-1i2	:	-----	:	-----	:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:	-----	:	-

	*	4920	*	4940	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	TACTCATCAAGGTCACATAACTTTCTCTGCACCG-TAGCTCTAACTGCTT	:		:	1341
BmANX_IX_Gen	:	TACTCATCAAGGTCACATAACTTTCTCTGCACCG-TAGCTCTAACTGCTT	:		:	4252
MsMH6/1-8i1	:	CACGGTCCCGGTCATGTAACCTTCCGTAGCTAACAGCTTTATGTGTCGC	:		:	1600
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	4960	*	4980	*	5000	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	CAGGCGCGCCAGTGCATGTGG---CCACTAGACGC-CTTAGTTTTACAA	:		:	1386
BmANX_IX_Gen	:	CAGGCGCGCCAGTGCATGTGG---CCACTAGACGC-CTTAGTTTTACAA	:		:	4297
MsMH6/1-8i1	:	GCTCGTGCACGAGGGTAACGGTTCCTCATTAGTTTTGTCTAGTTTTACAA	:		:	1650
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	*	5020	*	5040	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-A	:	GTAGTTCGAATTGTTTTTCAGGACGAAATCGCTGGTCCCTCGGCGACCTC	:		:	1436
BmANX_IX_Gen	:	GTAGTTCGAATTGTTTTTCAGGACGAAATCGCTGGTCCCTCGGCGACCTC	:		:	4347
MsMH6/1-8i1	:	GTAGTTGTTGGT-TTTTCAGGAGGACATAGGAGGTCCGCTCGGCGAACTC	:		:	1699
MsMF7/3-1i2	:	-----	:		:	-
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	5060	*	5080	*	5100	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	CTCTCGACAATGTGTTACTAGGCCGCTAGGCGTTAACACCGTATTACCAC	:		:	1070
BmANX_IX-A	:	CTCTCGACAATGTGTTACTAGGCCGCTAGGCGTTAACACCGTATTACCAC	:		:	1486
BmANX_IX_Gen	:	CTCTCGACAATGTGTTACTAGGCCGCTAGGCGTTAACACCGTATTACCAC	:		:	4397
MsMH6/1-8i1	:	CTATCAACAATGTGTTACTAAAGC-CTA--CACTGCTATAACATTAACAC	:		:	1746
MsMF7/3-1i2	:	CTATCAACAATGTGTTACTAAAGC-CTA--CACTGCTATAACATTAACAC	:		:	1060
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	*	5120	*	5140	*	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	CGCCATAACTGCAGCGCTGTGTGGAGTAATACTGCATTATACACGCATAG	:		:	1120
BmANX_IX-A	:	CGCCATAACTGCAGCGCTGTGTGGAGTAATACTGCATTATACACGCATAG	:		:	1536
BmANX_IX_Gen	:	CGCCATAACTGCAGCGCTGTGTGGAGTAATACTGCATTATACACGCATAG	:		:	4447
MsMH6/1-8i1	:	T-----CAGTATTAC---GAGCGCCATTCCGTTATACGC---CAA	:		:	1780
MsMF7/3-1i2	:	T-----CAGTATTAC---GAGCGCCATTCCGTTATACGC---CAA	:		:	1094
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

	5160	*	5180	*	5200	
BmANX_IX-C	:	-----	:		:	-
BmANX_IX-B	:	TTCACAATTAAGACGGGACTTCTTTGGGATAATTGTTACGATATATAATA	:		:	1170
BmANX_IX-A	:	TTCACAATTAAGACGGGACTTCTTTGGGATAATTGTTACGATATATAATA	:		:	1586
BmANX_IX_Gen	:	TTCACAATTAAGACGGGACTTCTTTGGGATAATTGTTACGATATATAATA	:		:	4497
MsMH6/1-8i1	:	CGCAGTGTCAAG-----TAAAGCAA-----ACTATTTAT----	:		:	1809
MsMF7/3-1i2	:	CGCAGTGTCAAG-----TAAAGCAA-----ACTATTTAT----	:		:	1123
MsMH5/1-1i1	:	-----	:		:	-

```

          *      5220          *      5240          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TACATGCATTGTGCCCGTTTGAAGTTCAGTTTAAATTGCAAACCGAATAT : 1220
BmANX_IX-A : TACATGCATTGTGCCCGTTTGAAGTTCAGTTTAAATTGCAAACCGAATAT : 1636
BmANX_IX_Gen : TACATGCATTGTGCCCGTTTGAAGTTCAGTTTAAATTGCAAACCGAATAT : 4547
MsMH6/1-8i1 : TGCATCTATTGTACCCG-----AGTACA--CTTATGTGCA----- : 1842
MsMF7/3-1i2 : TGCATCTATTGTAACCG-----AGTACA--CTTATGTGCA----- : 1156
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          5260          *      5280          *      5300
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TCGAATAATGAGAGTTCTCGGTCACGTTATATACGCCTTATGTAATCCAT : 1270
BmANX_IX-A : TCGAATAATGAGAGTTCTCGGTCACGTTATATACGCCTTATGTAATCCAT : 1686
BmANX_IX_Gen : TCGAATAATGAGAGTTCTCGGTCACGTTATATACGCCTTATGTAATCCAT : 4597
MsMH6/1-8i1 : -----TTTTAAAGACATTATATA--ATTAATTTAAGCTAT : 1875
MsMF7/3-1i2 : -----TTTTAAAGACATTATATA--ATTAATTTAAGCTAT : 1189
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      5320          *      5340          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TATACTTACGCGTATCGCATTTGAATATATTGCATAAATGTAAGCTATTT : 1320
BmANX_IX-A : TATACTTACGCGTATCGCATTTGAATATATTGCATAAATGTAAGCTATTT : 1736
BmANX_IX_Gen : TATACTTACGCGTATCGCATTTGAATATATTGCATAAATGTAAGCTATTT : 4647
MsMH6/1-8i1 : TTAATCATTGTGATTTCCATTCTCATGTATAGTCAGAAC----- : 1914
MsMF7/3-1i2 : TTAATCATTGTGATTTCCATTCTCATGTATAGTCAGTAC----- : 1228
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          5360          *      5380          *      5400
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TTGTAAGAATTTATTGTGATCACACATTACCCAAGCCGCAGTGTGCACG : 1370
BmANX_IX-A : TTGTAAGAATTTATTGTGATCACACATTACCCAAGCCGCAGTGTGCACG : 1786
BmANX_IX_Gen : TTGTAAGAATTTATTGTGATCACACATTACCCAAGCCGCAGTGTGCACG : 4697
MsMH6/1-8i1 : ---CAAGAAT-----GCACGTTT-----GAAGTTTGAGCG : 1941
MsMF7/3-1i2 : ---CAAGAAT-----GCACGTTT-----GAAGTTTGAGCG : 1255
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          *      5420          *      5440          *
BmANX_IX-C : ----- : -
BmANX_IX-B : TCGCGTGTTTGAAACTATGGGCCAGTTTTGTTTCCATTGCCGTTTTTGTT : 1420
BmANX_IX-A : TCGCGTGTTTGAAACTATGGGCCAGTTTTGTTTCCATTGCCGTTTTTGTT : 1836
BmANX_IX_Gen : TCGCGTGTTTGAAACTATGGGCCAGTTTTGTTTCCATTGCCGTTTTTGTT : 4747
MsMH6/1-8i1 : CAGTG-GTTTGAA-CTATGGGCCAGTTTA-----TTTTGTT : 1975
MsMF7/3-1i2 : CAGTG-GTTTGAA-CTATGGGCCAGTTTA-----TTTTGTT : 1289
MsMH5/1-1i1 : ----- : -

```

```

          5460          *      5480          *      5500
BmANX_IX-C : ----- : 994
BmANX_IX-B : CCGCTAACTT-TACTGCATAGCATTTTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGAAG : 1469
BmANX_IX-A : CCGCTAACTT-TACTGCATAGCATTTTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGAAG : 1885
BmANX_IX_Gen : CCGCTAACTT-TACTGCATAGCATTTTTTTCGGTCTTTGTTTACAGGAAG : 4796
MsMH6/1-8i1 : C-GCTAACATGTGAAGCGTGAGCGCGTTTTCCGCTGTTGTTTACAGGATG : 2024
MsMF7/3-1i2 : C-GCTAACATGTGAAGCGTGAGCGCGTTTTCCGCTGTTGTTTACAGGATG : 1338
MsMH5/1-1i1 : ----- : 987

```

GA G

```

          *          5520          *          5540          *
BmANX_IX-C : ACCTAACGGGTGACTTCAAGCATGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATC : 1044
BmANX_IX-B : ACCTAACGGGTGACTTCAAGCATGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATC : 1519
BmANX_IX-A : ACCTAACGGGTGACTTCAAGCATGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATC : 1935
BmANX_IX_Gen : ACCTAACGGGTGACTTCAAGCATGTGTTGGTCACGCTAAGTGCTTAAATC : 4846
MsMH6/1-8i1 : ACCTGACTGGTGACTTCAAGGAATGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CC : 2073
MsMF7/3-1i2 : ACCTGACTGGTGACTTCAAGGAATGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CC : 1387
MsMH5/1-1i1 : ACCTGACTGGTGACTTCAAGGAATGTGCTAGTCACACTTTGTGCTTAA-CC : 1036
          ACCT AC GGTGACTTCA G ATGTG T GTCAC CT GTGCTTAA C

```

```

          5560          *          5580          *          5600
BmANX_IX-C : CTACAAAAATAATAATTATATCGATTGTTTATTTTTTATAATATTGTTTTG : 1094
BmANX_IX-B : CTACAAAAATAATAATTATATCGATTGTTTATTTTTTATAATATTGTTTTG : 1569
BmANX_IX-A : CTACAAAAATAATAATTATATCGATTGTTTATTTTTTATAATATTGTTTTG : 1985
BmANX_IX_Gen : CTACAAAAATAATAATTATATCGATTGTTTATTTTTTATAATATTGTTTTG : 4896
MsMH6/1-8i1 : CTGCAATAC-----ATTA----GAGCTGTTATTTTTTATATGAATATTTGG : 2114
MsMF7/3-1i2 : CTGCAATAC-----ATTA----GAGCTGTTATTTTTTATATGAATATTTGG : 1428
MsMH5/1-1i1 : CTGCAATAC-----ATTA----GAGCTGTTATTTTTTATATGAATATTTGG : 1077
          CT CAA A ATTA GA TTATTTTTATA A T TTT G

```

```

          *          5620          *          5640          *
BmANX_IX-C : TCGCGCTTGACGCATGTGAATTACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAA : 1143
BmANX_IX-B : TCGCGCTTGACGCATGTGAATTACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAA : 1618
BmANX_IX-A : TCGCGCTTGACGCATGTGAATTACGGTA-GTTACAAAGTACGATGTGCAA : 2034
BmANX_IX_Gen : TCGCGCTTGACGCATGTGAATTACGGTA-G----- : 4925
MsMH6/1-8i1 : TTAAGCTTA--GCATGTTG-TTGCAGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGG : 2160
MsMF7/3-1i2 : TTAAGCTTA--GCATGTTG-TTGCAGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGG : 1474
MsMH5/1-1i1 : TTAAGCTTA--GCATGTTG-TTGCAGAACGCTACAAAGTACAATA-ATGG : 1123
          T GCTT GCATGT TT CGG A G taaaaagtac at

```

```

          5660          *          5680          *          5700
BmANX_IX-C : TTTGCAGGACGATACGAAAGGAGACTTCAAACGCGTGTACTCACCTTG : 1193
BmANX_IX-B : TTTGCAGGACGATACGAAAGGAGACTTCAAACGCGTGTACTCACCTTG : 1668
BmANX_IX-A : TTTGCAGGACGATACGAAAGGAGACTTCAAACGCGTGTACTCACCTTG : 2084
BmANX_IX_Gen : ----- : -
MsMH6/1-8i1 : TTTGCAGGACGATACGAAAGGCGACTTCAAACACGCGTGTACTGACCCTAG : 2210
MsMF7/3-1i2 : TTTGCAGGACGATACGAAAGGCGACTTCAAACACGCGTGTACTGACCCTAG : 1524
MsMH5/1-1i1 : TTTGCAGGACGATACGAAAGGCGACTTCAAACACGCGTGTACTGACCCTAG : 1173
          tttgcaggacgatacgaagg gacttcaaaccg gttact accct g

```

```

          *          5720          *          5740          *
BmANX_IX-C : TTTCGTAAGA--GCATAATAATAAGACTACAAATGTCCTCCAGCAACTGCC : 1241
BmANX_IX-B : TTTCGTAAGA--GCATAATAATAAGACTACAAATGTCCTCCAGCAACTGCC : 1716
BmANX_IX-A : TTTCGTAAGA--GCATAATAATAAGACTACAAATGTCCTCCAGCAACTGCC : 2132
BmANX_IX_Gen : ----- : -
MsMH6/1-8i1 : TGTCGTAGGGACGCATACGCATTATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCC : 2257
MsMF7/3-1i2 : TGTCGTAGGGACGCATACGCATTATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCC : 1571
MsMH5/1-1i1 : TGTCGTAGGGACGCATACGCATTATACTGCAGAC--CGATAG-ACATGCC : 1220
          t tcgta g gcata at a act ca a c ag a tgcc

```

```

          5760          *          5780          *          5800
BmANX_IX-C : TTTTCAATGTGTAAGTGTATGAGATATGTCCTTAGAAATTATAGCTTGAT : 1291
BmANX_IX-B : TTTTCAATGTGTAAGTGTATGAGATATGTCCTTAGAAATTATAGCTTGAT : 1766
BmANX_IX-A : TTTTCAATGTGTAAGTGTATGAGATATGTCCTTAGAAATTATAGCTTGAT : 2182
BmANX_IX_Gen : ----- : -
MsMH6/1-8i1 : TTTGACCCGTATAAGTGTATGAGAT---GTCTTAGAAATTAAAGCTTGAT : 2304
MsMF7/3-1i2 : TTTGAACCGTATAAGTGTATGAGAT---GTCTTAGAAATTAAAGCTTGAT : 1618
MsMH5/1-1i1 : TTTGAACCGTATAAGTGTATGAGAT---GTCTTAGAAATTAAAGCTTGAT : 1267
          ttt gt taactgtta gagat ttagaaatta agcttgat

```

**Abb. A8** (folgende Seite): *Alignment* (Matrix Blossum 62) der vorhergesagten Aminosäuresequenzen der drei potentiellen Isoformen des *M. sexta*-Annexin (MsANX\_IX-A, -B bzw. -C) mit den drei Isoformen des *B. mori*-Annexin IX (BmANX\_IX-A, -B, -C; *Accession no.* BAA92809 bis BAA92811). schwarz: 100 % Übereinstimmung der Basen in allen angegebenen Sequenzen, dunkelgrau: < 100 % - 80 % Übereinstimmung, hellgrau: < 80 % - 60 % Übereinstimmung

		*	20	*	40		
BmANX_IX-C :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAT	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
BmANX_IX-B :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAT	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
BmANX_IX-A :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAT	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
MsANX_IX-A :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAM	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
MsANX_IX-B :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAM	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
MsANX_IX-C :	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKAM	KGFGTDEKAIIDVLC	:	49			
	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEPFDPAADAETLRKA	KGFGTDEKAIIDVLC					
	*	60	*	80	*	1	
BmANX_IX-C :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELT	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
BmANX_IX-B :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELT	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
BmANX_IX-A :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELT	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
MsANX_IX-A :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELS	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
MsANX_IX-B :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELS	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
MsANX_IX-C :	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSELS	GNLENVIVALMTPLPHFY	:	98			
	RRGIVQRLEIAETFKTNYGKDLISELKSEL	GNLENVIVALMTPLPHFY					
	00	*	120	*	140		
BmANX_IX-C :	AKELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLY	GKSLESDDL	:	147			
BmANX_IX-B :	AKELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLY	GKSLESDDL	:	147			
BmANX_IX-A :	AKELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLY	GKSLESDDL	:	147			
MsANX_IX-A :	AKELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYN	GKSLESDDL	:	147			
MsANX_IX-B :	AKELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYN	GKSLESDDL	:	147			
MsANX_IX-C :	AKELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYN	GKSLESDDL	:	147			
	AKELHDAV G	GTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLY					
	*	160	*	180	*		
BmANX_IX-C :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGI	DEGSAKADAEALAA	AGEGQWGTD	:	196		
BmANX_IX-B :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGI	DEGSAKADAEALAA	AGEGQWGTD	:	196		
BmANX_IX-A :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGI	DEGSAKADAEALAA	AGEGQWGTD	:	196		
MsANX_IX-A :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGV	DEGAARADAEALAN	AGEGQWGTD	:	196		
MsANX_IX-B :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGV	DEGAARADAEALAN	AGEGQWGTD	:	196		
MsANX_IX-C :	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQGV	DEGAARADAEALAN	AGEGQWGTD	:	196		
	KGDTSGHFKRLCVSLCMANRDENQG	DEG A	ADAEALA	AGEGQWGTD			
	200	*	220	*	240		
BmANX_IX-C :	ESIFNSILITRSYQQLRQIFAEYEALTGKDIED	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
BmANX_IX-B :	ESIFNSILITRSYQQLRQIFAEYEALTGKDIED	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
BmANX_IX-A :	ESIFNSILITRSYQQLRQIFAEYEALTGKDIED	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
MsANX_IX-A :	ESVFNSILITRSYQQLRQIFAEFEALTGKDIEE	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
MsANX_IX-B :	ESVFNSILITRSYQQLRQIFAEFEALTGKDIEE	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
MsANX_IX-C :	ESVFNSILITRSYQQLRQIFAEFEALTGKDIEE	SIKKEFSGSIEKGMLA	:	245			
	ES FNSILITRSYQQLRQIFAE	EALTGKDIE	SIKKEFSGSIEKGMLA				
	*	260	*	280	*		
BmANX_IX-C :	IAKCVKSKVGFFAERLYYSMKGI	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
BmANX_IX-B :	IAKCVKSKVGFFAERLYYSMKGI	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
BmANX_IX-A :	IAKCVKSKVGFFAERLYYSMKGI	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
MsANX_IX-A :	IVKCVKSKVGFFAERLYYSMKGL	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
MsANX_IX-B :	IVKCVKSKVGFFAERLYYSMKGL	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
MsANX_IX-C :	IVKCVKSKVGFFAERLYYSMKGL	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF	:	294		
	I KCVKSKVGFFAERLYYSMKG	GTNDKTLIRIVVSRSEIDL	GDIKQAF				
	300	*	320				
BmANX_IX-C :	LEKYGKSLETWIAEDLTGDFKHVLVTL	SA-	:	323			
BmANX_IX-B :	LEKYGKSLETWIADEIAGPLGDL	LSTMCY-	:	323			
BmANX_IX-A :	LEKYGKSLETWIADDTSGDYKKALL	TLVDK	:	324			
MsANX_IX-A :	LDKYGKPLESWIADDTSGDYKKALL	TLVE-	:	323			
MsANX_IX-B :	LDKYGKPLESWIAEDIGGPLGELL	LSTMCY-	:	323			
MsANX_IX-C :	LDKYGKPLESWIADDLTGDFRNV	LVTLCA-	:	323			
	L KYGK LE WIA d G	L T					



---

**Abb. A9** (folgende Seite): *Alignment* (Matrix Blosum 62) der vorhergesagten Aminosäuresequenzen der drei putativen *M. sexta*-Annexin-Isoformen (Ms\_ANX\_IX-A, -B bzw. -C) mit den drei Isoformen A, B bzw. C von *B. mori*-Annexin IX (Bm\_ANX\_IX-A, -B bzw. -C; *Accession no.* siehe Abb. A6) und mit Annexin B9 von *D. melanogaster* (Dm\_ANX\_IX\_B9; *Accession no.* P22464 [Genbank]). schwarz: 100 % Übereinstimmung der Basen in allen angegebenen Sequenzen, dunkelgrau: < 100 % - 80 % Übereinstimmung, hellgrau: < 80 % - 60 % Übereinstimmung. Motivmarkierung (Vorhersage mittels des Programms „MyHits“ und der Pfam-Datenbank; Motiv: [TG]-[STV]-x(8)-[LIVMF]-x(2)-R-x(3)-[DEQNH]-x(7)-[IFY]-x(7)-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFA]-x(2)-[LIVMF]), das konservierte Arginin ist mit einem Stern gekennzeichnet: Annexin *repeated domain 1* orange, Annexin *repeated domain 2* gold, Annexin *repeated domain 3* helles orange, Annexin *repeated domain 4* rot; die unterstrichenen Bereiche stellen mit dem Programm PSIPRED vorhergesagte  $\alpha$ -Helices bei den *M. sexta*-Annexin-Isoformen dar; bei vier Typ II Calcium-bindenden Motiven G-x-GTDE-x(36)-[ED] in allen Sequenzen sind die Buchstaben schattiert dargestellt und die gesamte Sequenz des Motivs ist in einer gesonderten Zeile schwarz unterstrichen | | | | | | ——— |

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: MSSAEYYPFKCTPTVPYPADPFDPVEDAAILRKAMKGFGTDEKAIIEILAR : 50  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKATKGFGTDEKAIIDVILAR : 50  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKATKGFGTDEKAIIDVILAR : 50  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKATKGFGTDEKAIIDVILAR : 50  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKAMKGFGTDEKAIIDVILAR : 50  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKAMKGFGTDEKAIIDVILAR : 50  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : MSGQYYYPYKCTPTVPYPAPFPDPADAAITLRKAMKGFGTDEKAIIDVILAR : 50

\*

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: RGIVQRLEIAEAFKTSYGKDLISDLKSELGKGFEDVILALMTPLPQFYAQ : 100  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELTGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELTGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELTGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELSGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELSGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : RGIVQRLEIAEAFKTNYGKDLISDLKSELSGMIENVIALMTPLPHFYAK : 100

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: ELHDAISGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIKTIQFYEQSFCKSLES DLKGD : 150  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : ELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYCKSLES DLKGD : 150  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : ELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYCKSLES DLKGD : 150  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : ELHDAVSGIGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYCKSLES DLKGD : 150  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : ELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYNKSLES DLKGD : 150  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : ELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYNKSLES DLKGD : 150  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : ELHDAVAGLGTDEEAIIEILCTLSNYGIRTISAFYEQLYNKSLES DLKGD : 150

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: TSGHFKRLCVSLVQGNRDENQGVDEAAAIADAQALHDAGEGQWGTDSETF : 200  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGIDEGSAKADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGIDEGSAKADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGIDEGSAKADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGVDEGAARADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGVDEGAARADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGVDEGAARADAAALAAAGEGQWGTDSETF : 200

\*

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: NSILITRSYQQLRQIFLEYENLSGNDIEKAIKREFSGSVEKGLAIVKCC : 250  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : NSILITRSYQQLRQIFAEEYEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIAKCV : 250  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : NSILITRSYQQLRQIFAEEYEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIAKCV : 250  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : NSILITRSYQQLRQIFAEEYEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIAKCV : 250  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : NSILITRSYQQLRQIFAEEFEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIVKCV : 250  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : NSILITRSYQQLRQIFAEEFEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIVKCV : 250  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : NSILITRSYQQLRQIFAEEFEALTGNDIEDSIKNEFSGSIEKGLAIVKCV : 250

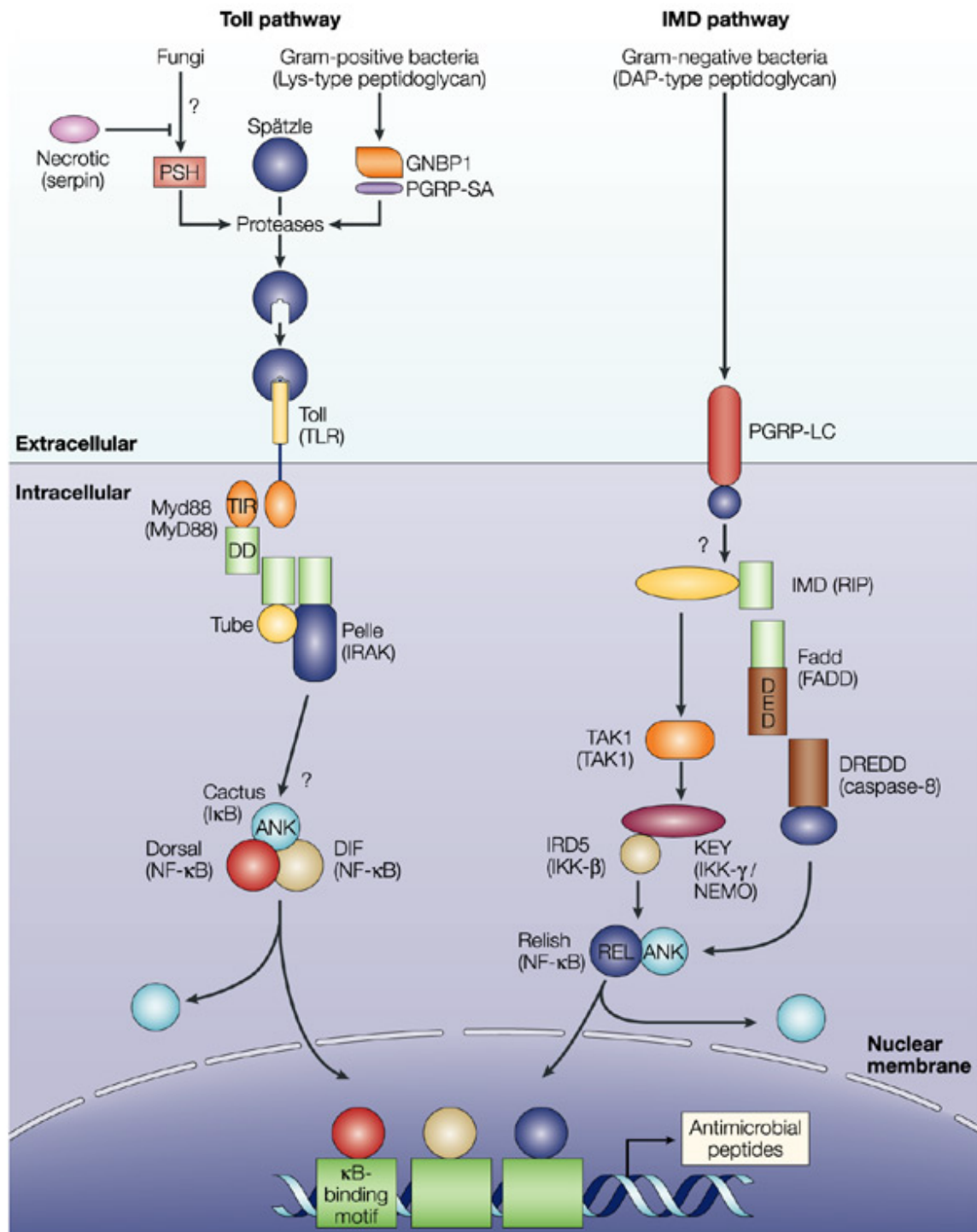
\*

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: KSKIDYFSERLHDSMAGMSTKDKTLIRIIVSRSEIDLGDIKEAFQNKYGK : 300  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFLEKYGK : 300  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFLEKYGK : 300  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFLEKYGK : 300  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFIDKYGK : 300  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFIDKYGK : 300  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : KSKVGFFAERLYYSMKGIGTNDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFIDKYGK : 300

Dm\_ ANX\_ IX\_ B9: SLESWIKEDAEVDIGYVIVTLTAW : 324  
 Bm\_ ANX\_ IX- C : SLETWIAEDLTGDFKHVIVTLTSA- : 323  
 Bm\_ ANX\_ IX- B : SLETWIADEIAGPLGDLISTMCY- : 323  
 Bm\_ ANX\_ IX- A : SLETWIAEDTSGDYKKALLTLVVDK : 324  
 Ms\_ ANX\_ IX- A : PLESWIAEDTSGDYKKALLTLVE- : 323  
 Ms\_ ANX\_ IX- B : PLESWIAEDIGGPLIGELLISTMCY- : 323  
 Ms\_ ANX\_ IX- C : PLESWIAEDLTGDFRNVIVTLTCA- : 323

Ms_ANX_IX-A	:	MSGQQYYPYKCTPTVYPAEFPDPAADAETL	:	30
Ms_ANX_IX-A	:	RKAMKGFGTDEKAIIDVLCRRGIVQRLEIA	:	60
Ms_ANX_IX-A	:	ETFKTNYGKDLISELKSELSGNLENVIVAL	:	90
Ms_ANX_IX-A	:	MTPLPHFYAKELHDAVAGLGTFEEAIIIEIL	:	120
Ms_ANX_IX-A	:	CTLSNYGIRTISAFYEQLYNKSLESCLKGD	:	150
Ms_ANX_IX-A	:	TSGHFKRLCVSLCMANRDENQGVDEGAARA	:	180
Ms_ANX_IX-A	:	DAEALANAGEGQWGTDSESVFNSILITRSYQ	:	210
Ms_ANX_IX-A	:	QLRQIFAEFEALTGKDIEESIKKEFSGSIE	:	240
Ms_ANX_IX-A	:	KGMLAIVKCVKSKVGFFAERLYYSMKGLGT	:	270
Ms_ANX_IX-A	:	NDKTLIRIVVSRSEIDLGDIKQAFCLKYCK	:	300
Ms_ANX_IX-A	:	PLESWIADDTSGDYKKALLTLVE-	:	323
Ms_ANX_IX-B	:	EDIGGPLGELLSTM CY-	:	323
Ms_ANX_IX-C	:	DDLTDGDFRNVLVTLCA-	:	323

**Abb. A10:** *Alignment* (Matrix Blossum 62) der vorhergesagten Aminosäuresequenzen der putativen *M. sexta*-Annexin-Isoformen (Ms\_ANX\_IX-A, -B bzw. -C). Zur besseren Übersichtlichkeit ist die Teilsequenz, die allen drei Isoformen gemeinsam ist, nur bei Isoform A dargestellt. Völlige Übereinstimmungen zwischen allen drei Sequenzen sind schwarz hinterlegt, bei Übereinstimmungen zwischen zwei Sequenzen ist der Hintergrund dunkelgrau. Motivmarkierungen: Annexin *repeated domains* siehe Abbildung A9, mögliche weitere Motive, die mit dem Programm „MyHits“ vorausgesagt wurden: N-Glykosylierungsmotiv N-{P}-{ST}-{P} (grün), Caseinkinase II Phosphorylierungsmotive [ST]-x(2)-[DE] (magenta), Myristylierungsmotive G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P} (grau), Proteinkinase C Phosphorylierungsmotive [ST]-x-[RK] (türkis). Außerdem ist ein KGD-Motiv gekennzeichnet (blau).



Nature Reviews | Immunology

Abb. A11: Signaltransduktion über Toll- und Imdweg (LEMAITRE 2004)

**Tab. B1:** Blast-Ergebnisse des EST-Projekts der Hämozyten-cDNA-Bank von 11/2002 (überarbeitet 10/2004). Dargestellt sind die Blastn- und Blastx-Vergleiche (EMBL-WU-Blast2) für das 5'- und das 3'-Ende der Sequenz mit einer oder mehreren hohen Wahrscheinlichkeiten P(N). RPT = wiederholte Sequenzierung; Annexin IX-Klone, die im Rahmen des EST-Projektes ansequenziert wurden: Klon G01 = MH5/1-1i1, G02 = MH6/1-8i1, G03= MF8/1-1i2, G04 = MF7/1-2i3, G05 = MF7/2-5i1, G06 = MF7/3-1i2

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
A 01	<i>D. melanogaster</i> RE50273 Klon (884; 3,4 e <sup>-33</sup> ) <u>AY089633</u>	<i>D. melanogaster</i> CG4944-PA Protein (460; 2,0 e <sup>-42</sup> ) <u>O97428</u>	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 Chromosom 2 (466; 1,3 e <sup>-11</sup> ) <u>AE001395</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Sequenz F15O4.29 (77; 0,65) <u>Q9LQF6</u>
A 02	<i>Trichoplusia ni</i> gloverin precursor cDNA (860, 4,2 e <sup>-32</sup> ) <u>AF233590</u>	<i>T. ni</i> Gloverin Vorläufer (544; 2,5 e <sup>-51</sup> ) <u>Q9GQM3</u>	<i>Epirrita autumnata</i> tRNA-Met Gen und 12S rRNA Gen (383; 2,8 e <sup>-07</sup> ) <u>AF513853</u>	-
A 03	unbekanntes Taxon patentierte Sequenz (405; 9,1 e <sup>-11</sup> ) <u>AR184181</u> ; <i>D. melanogaster</i> "mRNA for Elastin like protein (Fragment)" (353; 2,7 e <sup>-08</sup> ) <u>DMELAST</u>	<i>D. melanogaster</i> putatives Omega-Protein; (272; 2,2 e <sup>-21</sup> ) <u>Q9VUH1</u>	<i>H. sapiens</i> genomische DNA, chromosome 21q, Klon: RP11-42M17 (677; 1,0 e <sup>-22</sup> ) <u>AP000459</u>	<i>Mus musculus</i> Gcap1 Protein (Fragment) (67; 0,996) <u>Q61402</u>
A 04	<i>B. mori</i> bmtub1 Gen für beta-Tubulin (3559; 2,4 e <sup>-154</sup> ) <u>AB072307</u> ; <i>M. sexta</i> beta-1 tubulin mRNA (3486; 4,8 e <sup>-151</sup> ) <u>AF030547</u>	<i>B. mori</i> Beta-tubulin (1360; 8,5 e <sup>-138</sup> ) <u>Q8T8B3</u> ; <i>M. sexta</i> Tubulin beta-1 Kette (Beta-1 tubulin) (1357; 1,8e <sup>-137</sup> ) <u>O17449</u>	<i>B. mori</i> bmtub1 Gen für Beta-Tubulin (2300; 2,3 e <sup>-108</sup> ) <u>AB072307</u> ; <i>M. sexta</i> beta-1 tubulin mRNA (2279; 1,6 e <sup>-96</sup> ) <u>AF030547</u>	<i>B. mori</i> Beta-tubulin (689; 1,4e <sup>-74</sup> ) <u>Q8T8B3</u> ; <i>M. sexta</i> Tubulin beta-1 Kette (Beta-1 tubulin) (683; 6,0 e <sup>-74</sup> ) <u>O17449</u>
A 05	"chloroplast transformation vector" (2208; 2,2 e <sup>-111</sup> ) <u>CTR312392</u> ; unbekanntes Taxon patentierte Sequenz (2303 1,9 e <sup>-108</sup> ) <u>AX020190</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (329; 1,5 e <sup>-28</sup> ) <u>Q57344</u>	Klonierungsvektor (2610; 3,9 e <sup>-122</sup> ) <u>CV35134</u>	<i>Myxococcus xanthus</i> SocE Protein (220; 2,8 e <sup>-16</sup> ) <u>Q9KHC4</u> ; <i>D. melanogaster</i> Lethal (2) 37CC Protein (209; 7,7 e <sup>-16</sup> ) <u>Q9VIZ4</u>
A 06	<i>D. melanogaster</i> GH1377 cDNA (737; 5,5 e <sup>-26</sup> ) <u>AY060295</u>	<i>D. melanogaster</i> "Splice isoform Class 3 of Q24522 Bunched protein (256; 1,4 e <sup>-20</sup> ) <u>Q24522-2</u>	<i>M. musculus</i> XRCC4 mRNA (304; 0,0020) <u>AB055154</u>	<i>Oryza sativa</i> hypothetisches 12,3 kDa Protein; (76; 0,9997) <u>Q9FW14</u>
A 07	"chloroplast transformation vector" (4163; 3,0 e <sup>-212</sup> ) <u>CTR312392</u> ; unbekanntes Taxon patentierte Sequenz (4467; 2,6 e <sup>-194</sup> ) <u>AR140325</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (332; 7,4 e <sup>-29</sup> ) <u>Q57344</u>	Klonierungsvektor (4849; 1,0 e <sup>-231</sup> ) <u>CV35128</u>	Plasmid ColE1 13,8 kDa ORF (351; 6,8 e <sup>-31</sup> ) <u>Q51613</u> ; <i>M. xanthus</i> SocE Protein (249; 2,0 e <sup>-19</sup> ) <u>Q9KHC4</u>
A 08	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (346; 1,5 e <sup>-08</sup> ) <u>AX337023</u> ; <i>N. tabacum</i> mRNA für BYJ6 (340; 2,2 e <sup>-08</sup> ) <u>NTAB5878</u>	<i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein" (11; 1,9 e <sup>-05</sup> ) <u>Q24333</u>	<i>Penicillium marneffe</i> STS Klon pm4a6.g. (276; 1,5 e <sup>-06</sup> ) <u>PM4A6G</u>	<i>H. sapiens</i> "Basic proline-rich peptide IB-1" (83; 7,4 e <sup>-05</sup> ) <u>P04281</u>
A 08 RPT	<i>M. sexta</i> patentierte Sequenz (2608; 2,7 e <sup>-111</sup> ) <u>AX133531</u>	<i>Anopheles gambiae</i> Beta nu integrin subunit AgBnu (339; 1,4 e <sup>-28</sup> ) <u>Q8T5U7</u>	<i>M. sexta</i> patentierte Sequenz (2608; 2,7 e <sup>-111</sup> ) <u>AX133531</u>	<i>Xenopus laevis</i> Integrin beta-3 Untereinheit Vorläufer (206; 7,8 e <sup>-18</sup> ) <u>Q07012</u>
A 09	<i>Aedes triseriatus</i> "putative chaperonin containing t-complex Polypeptide 1 CCT delta subunit mRNA" (1244; 4,3 e <sup>-63</sup> ) <u>AF271209</u>	<i>D. melanogaster</i> CG5525 Protein (829; 1,6 e <sup>-81</sup> ) <u>Q9VK69</u>	<i>Dictyostelium discoideum</i> KAX-3 LagC Protein (lagC) mRNA (314; 2,2 e <sup>-07</sup> ) <u>DD09478</u>	<i>H. sapiens</i> Hypothetisches Protein (121; 0,0010) <u>Q9HBQ9</u>
A 10	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (353; 4,1 e <sup>-08</sup> ) <u>AX337023</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00071) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0042) <u>Q24333</u>	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 chromosome 2 (Teilsequenz) (251; 0,00023) <u>AE001378</u>	-
A 11	<i>Glycine max</i> patentierte Sequenz (429; 1,5 e <sup>-12</sup> ) <u>AX406874</u>	<i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (105; 0,00017) <u>Q24333</u>	<i>Plasmodium falciparum</i> CDP-diacylglycerol Synthase Gen, Promoterregion und 5' UTR (289; 0,0070) <u>AF443276</u>	-

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
A 12	<i>M. sexta</i> "V-ATPase 110 kDa integrale membrane subunit mRNA" (866; 2,2 e <sup>-31</sup> ) <a href="#">AF173553</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (89; 0,024) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (77; 0,92) <a href="#">Q24333</a>	<i>D. melanogaster</i> DNA Sequenz (P1s DS00543 (D193) und DS02867 (D200)) (639; 5,4 e <sup>-21</sup> ) <a href="#">AC004642</a>	<i>D. melanogaster</i> CG3803 Protein (362; 4,7 e <sup>-32</sup> ) <a href="#">Q9W1F5</a>
B 01	–	<i>Ensis minor</i> Kernprotein (89; 0,94) <a href="#">Q24898</a>	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (283; 0,012) <a href="#">AX345192</a>	<i>Caenorhabditis elegans</i> Hypothetisches Protein Y53F4A.2 (68; 0,82) <a href="#">Q9NAC9</a>
B 01 RPT	–	–	unidentifizierter Organismus patentierte Sequenz (595; 3,5 e <sup>-20</sup> ) <a href="#">AR125361</a>	<i>Sarcophaga peregrina</i> 26/29 kDa Proteinase (437; 1,3 e <sup>-53</sup> ) <a href="#">Q97453</a>
B 02	<i>H. sapiens</i> Chromosom 16 Klon RP11-715J22 (586; 1,3 e <sup>-18</sup> ) <a href="#">AC106820</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (120; 5,4 e <sup>-86</sup> ) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (102; 0,00098) <a href="#">Q24333</a>	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase (PPO) Gen (4206; 1,1 e <sup>-183</sup> ) <a href="#">MSPPO</a>	<i>M. sexta</i> Phenoloxidase Vorläufer (pro-PO) (871; 5,4 e <sup>-86</sup> ) <a href="#">Q25519</a>
B 03	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (366; 1,1 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">AX062918</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (120; 1,0 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (102; 0,00098) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 13, Klon RP11-342C20 (372; 2,1 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">AL360267</a>	"White spot syndrome virus" (WSSV) Wsv193 Protein (46; 0,99) <a href="#">Q8VB14</a>
B 04	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (375; 4,1 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">AX337023</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (111; 0,00010) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0044) <a href="#">Q24333</a>	<i>Ovis aries</i> "MARC 15067-15068: 1012336549:1 Sheep WBC Ovis aries STS genomic, sequence tagged site (203; 3,0 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">G74997</a>	<i>A. thaliana</i> Gb AAD23008.1 Protein (143; 1,3 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q9FLQ7</a>
B 05	unbekanntes Taxon patentierte Sequenz (523; 2,9 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">AR170122</a>	<i>Culex tritaeniorhynchus</i> Carboxylesterase b1 (374; 2,6 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">Q9GU95</a>	<i>H. sapiens</i> Xp22 BAC GSHB-536K7 (310; 0,0018) <a href="#">AC004616</a>	<i>B. mori</i> "Esterase-like protein (ESR-LP) (Fragment)" (186; 1,9 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">Q9BLK9</a>
B 06	<i>D. melanogaster</i> Klon GM13116 (747; 4,2 e <sup>-26</sup> ) <a href="#">AY058483</a>	<i>D. melanogaster</i> GM13116p Protein (327; 3,2 e <sup>-44</sup> ) <a href="#">Q95TV9</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 1p13.1-13.3, Klon RP4-730H16 (489; 6,9 e <sup>-16</sup> ) <a href="#">HSJ730H16</a>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> "Hypothetical 13,6 kDa protein in VHT1-ROM1 intergenic region" (82; 0,12) <a href="#">P53245</a>
B 07	<i>M. sexta</i> "juvenile hormone binding protein (hJHBP) gene, hJHBP-Snb allele" (1059; 4,5 e <sup>-40</sup> ) <a href="#">AF527635</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00077) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0044) <a href="#">Q24333</a>	<i>P. falciparum</i> 3D7 MAL3P2 (410; 3,5 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">PFMAL3P2</a>	–
B 08	<i>Calothrix</i> sp. Calothrix D253 genomische DNA, Klon AG13 (336; 2,2 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">CSPAG13</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (91; 0,015) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (77; 0,91) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 5, Klone CTD-2187O10 (293; 0,0094) <a href="#">AC025770</a>	–
B 09	<i>Chondrus crispus</i> patentierte Sequenz (338; 5,6 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">AX047064</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (106; 0,00017) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0023) <a href="#">Q24333</a>	<i>Mesocricetus auratus</i> "mRNA for ribonucleotide reductase M2 subunit" (2544; 1,6 e <sup>-122</sup> ) <a href="#">MARIREDM2</a>	<i>M. xanthus</i> SocE Protein (243; 1,1 e <sup>-17</sup> ) <a href="#">Q9KHC4</a>
B 09 RPT	unbekanntes Taxon patentierte Sequenz (1342; 7,4 e <sup>-53</sup> ) <a href="#">AR088705</a>	Klonierungsvektor "Fused-ccdB protein" (221; 7,3 e <sup>-23</sup> ) <a href="#">Q53022</a>		
B 10	<i>Epirrita autumnata</i> "tRNA-Met gene, partial sequence; and 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products" (577; 2,9 e <sup>-17</sup> ) <a href="#">AF513853</a>	<i>D. melanogaster</i> CG14996 Protein ("Calponin-like protein Chd64") (159; 6,0 e <sup>-10</sup> ) <a href="#">Q9VZ11</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 10, Klon RP11-506M13 (691; 2,4 e <sup>-23</sup> ) <a href="#">AC068139</a>	<i>Borrelia parkeri</i> BdrC1-Protein (82; 0,9998) <a href="#">Q9RGB6</a>

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
B 11	<i>M. sexta</i> "soluble guanylyl cyclase beta-1 subunit mRNA" (526; 4,2 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">AF062751</a> ; <i>M. sexta</i> "V-ATPase 110 kDa integral membrane subunit mRNA" (522; 7,8 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">AF173553</a>	<i>Paramecium bursaria chlorella</i> Virus 1 (PBCV-1) A312aR Protein (98; 0,0027) <a href="#">O41021</a>	<i>P. falciparum</i> MAL3P5 (416; 8,1 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">PFMAL3P5</a>	<i>Swertia perennis</i> Maturase (Fragment) (80; 0,99) <a href="#">CAD33592</a>
B 12	<i>P. xuthus</i> "ORF1, ORF2 genes for gag-like protein" (584; 1,3 e <sup>-18</sup> ) <a href="#">AB078935</a> ; <i>B. mori</i> "BmKMO gene for kynurenine 3-monooxygenase" (571; 3,7 e <sup>-17</sup> ) <a href="#">AB063490</a> ; <i>M. sexta</i> "eclosion hormone gene", exons 2 and 3, Klon lambda D39" (496; 1,8 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">MSECLH3</a>	<i>P. xuthus</i> Reverse transcriptase (346; 4,2 e <sup>-29</sup> ) <a href="#">Q8MY33</a>	<i>Papilio xuthus</i> "ORF1, ORF2 genes for gag-like protein" (722; 7,0 e <sup>-25</sup> ) <a href="#">AB078929</a>	<i>P. xuthus</i> Reverse transcriptase ; (361; 1,0 e <sup>-30</sup> ) <a href="#">Q8MY31</a>
C 01	unidentifizierter Organismus patentierte Sequenz (357; 2,2 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">AR184181</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (108; 0,00022) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0044) <a href="#">Q24333</a>	HIV-1 "isolate DD88477V1V2 envelope glycoprotein (env) gene" (198; 0,62) <a href="#">AF315960</a>	–
C 02	<i>M. musculus</i> "Apexp1, Cbx3p1 pseudogenes for Apex nuclease, chromobox homolog 3" (384; 5,7 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">AB084238</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (88; 0,032) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (82; 0,14) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> on Chromosom 1, Klon RP11-177F15 (439; 1,3 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">AL513209</a>	–
C 03	<i>N. tabacum</i> mRNA für BYJ15 (366; 7,9 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">NTAB5878</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (105; 0,00044) <a href="#">Q57344</a> ; <i>N. tabacum</i> BYJ15 Protein (Fragment) (112; 0,0015) <a href="#">Q24126</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 14, "DNA sequence BAC R-1042B17 of library RPCI-11" (521; 8,2 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">CNS0000Q</a>	<i>E. coli</i> "Microcin 24 immunity protein" (69; 0,97) <a href="#">Q46970</a>
C 04	<i>H. armigera</i> actA3b Gen (2055; 5,3 e <sup>-159</sup> ) <a href="#">HAACTA3B</a> ; <i>M. sexta</i> Actin mRNA (3310; 6,0 e <sup>-143</sup> ) <a href="#">MSACTINX</a>	<i>B. mori</i> Actin, zytoplasmatisches Actin A3 (1362; 5,3 e <sup>-138</sup> ) <a href="#">P04829</a>	<i>Helicoverpa armigera</i> actA3b Gen (3176; 4,5 e <sup>-137</sup> ) <a href="#">HAACTA3B</a>	<i>B. mori</i> Actin, zytoplasmatisches Actin A4 (757; 1,7 e <sup>-78</sup> ) <a href="#">P84183</a>
C 05	<i>Frankliniella occidentalis</i> Cysteineprotease CP14 Vorläufer (588; 7,0 e <sup>-20</sup> ) <a href="#">AF410882</a>	<i>Sacrophaga peregrina</i> 26,29 kDa Proteinase (572; 2,7 e <sup>-54</sup> ) <a href="#">Q97453</a>	<i>Platichthys flesus</i> Ki-ras Gen (Exons 1 bis 4) (301; 0,0030) <a href="#">PFL17188</a>	<i>Sacrophaga peregrina</i> 26,29 kDa Proteinase (152; 1,4 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">Q97453</a>
C 06	<i>D. melanogaster</i> "GM14682 full length cDNA" (1717; 5,6 e <sup>-71</sup> ) <a href="#">AY058493</a>	<i>D. melanogaster</i> CG6050 Protein (825; 1,1 e <sup>-90</sup> ) <a href="#">Q9V6Q7</a>	<i>D. melanogaster</i> Chromosom 2R, Region 50A-50B, BAC Klon BACR36J03 (1763; 1,6 e <sup>-72</sup> ) <a href="#">AC091634</a>	<i>D. melanogaster</i> CG6050 Protein (921; 8,6 e <sup>-100</sup> ) <a href="#">Q9V6Q7</a>
C 07	<i>B. mori</i> bmtua1 Gen für alpha-Tubulin (3350; 3,6 e <sup>-145</sup> ) <a href="#">AB072304</a>	<i>Chironomus tentans</i> Alpha-Tubulin (1334; 4,9 e <sup>-135</sup> ) <a href="#">Q964U9</a> ; <i>D. melanogaster</i> Tubulin alpha-1 Kette (1332; 7,9 e <sup>-135</sup> ) <a href="#">P06603</a> ; <i>B. mori</i> Tubulin alpha Kette (1328; 2,1 e <sup>-134</sup> ) <a href="#">P52273</a>	<i>B. mori</i> bmtua1 Gen für alpha-Tubulin (3353; 6,3 e <sup>-145</sup> ) <a href="#">AB072304</a>	<i>Chironomus tentans</i> Alpha-Tubulin (1205; 7,7 e <sup>-131</sup> ) <a href="#">Q964U9</a> ; <i>D. melanogaster</i> Tubulin alpha-1 Kette (1202; 1,6 e <sup>-130</sup> ) <a href="#">P06603</a> ; <i>B. mori</i> Tubulin alpha Kette (1199; 1,4 e <sup>-129</sup> ) <a href="#">P52273</a>

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
C 08	<i>M. sexta</i> "general odorant-binding protein (GOBP2) and pheromone-binding protein 1 (PBP1) genes" (900; 7,3 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">AF323972</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (89; 0,012) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (85; 0,032) <a href="#">Q24333</a>	—	—
C 08 RPT	<i>M. sexta</i> "general odorant-binding protein (GOBP2) and pheromone-binding protein 1 (PBP1) genes"; (1116; 2,5 e <sup>-61</sup> ) <a href="#">AF323972</a> ; <i>M. sexta</i> "hemolymph juvenile hormone binding protein (hJHBP) gene, hJHBP-Snb allele" (839; 4,1 e <sup>-30</sup> ) <a href="#">AF323972</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00071) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0043) <a href="#">Q24333</a>		
C 09	<i>H. sapiens</i> DNA Sequenz Chromosom 13, Klon RP11-488P11 (530; 3,8 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">AL590063</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (106; 0,00036) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0044) <a href="#">Q24333</a>	<i>M. sexta</i> "hemolymph juvenile hormone binding protein precursor, gene" (733; 1,0 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">AF226857</a>	<i>D. melanogaster</i> LD14453p Protein (65; 0,99994) <a href="#">Q95RS2</a>
C 10	<i>H. sapiens</i> "human nucleotide-binding protein mRNA" (948; 3,3 e <sup>-36</sup> ) <a href="#">HS8334</a>	<i>H. sapiens</i> "nucleotide-binding protein 1 (NBP 1) NEDD8 ultimate buster-1 (NY-REN-18 antigen)" (358; 8,4 e <sup>-55</sup> ) <a href="#">Q9Y5A7</a>	<i>M. musculus</i> "nucleotide-binding protein" (1159; 9,2 e <sup>-46</sup> ) <a href="#">AF114170</a>	<i>H. sapiens</i> "nucleotide-binding protein 1 (NBP1) NEDD8 ultimate buster-1 (NY-REN-18 antigen)" (289; 1,2 e <sup>-62</sup> ) <a href="#">Q9Y5A7</a>
C 11	<i>H. sapiens</i> BAC "clone RP11-325A18 from 2" (521; 1,4 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">AC109637</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (105; 0,00047) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0045) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> DNA Sequenz Chromosom X, Klon RP13-324D24 (523; 1,2 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">AL731768</a>	—
C 12	<i>Calothrix</i> sp. D253 genomische DNA, Klon AG13 (295; 2,0 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">CSPAG13</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (91; 0,016) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (78; 0,81) <a href="#">Q24333</a>	<i>Hyphantria cunea</i> Serpin Gen (556; 1,9 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">AF151527</a>	—
D 01	<i>D. melanogaster</i> "mRNA for vanin-like protein" (601; 1,3 e <sup>-19</sup> ) <a href="#">DME276261</a>	<i>D. melanogaster</i> "Vanin-like protein 1 precursor." (502; 7,1 e <sup>-47</sup> ) <a href="#">Q8IRR1</a>	<i>D. melanogaster</i> "mitochondrial A+T region" (576; 7,7 e <sup>-17</sup> ) <a href="#">MIDMMU115</a>	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i> "hypothetical protein (Fragment)" (74; 1,9) <a href="#">Q7RAY2</a>
D 02	<i>Aedes aegypti</i> "putative polyadenylate-binding protein (PABP) mRNA" (1394; 3,3 e <sup>-56</sup> ) <a href="#">AY038043</a>	<i>M. musculus</i> "poly A binding protein, cytoplasmic 1" (756; 2,6 e <sup>-51</sup> ) <a href="#">Q99L36</a>	<i>H. sapiens</i> cDNA von Klon DKFZp434M108 (736; 2,3 e <sup>-32</sup> ) <a href="#">HSM801868</a>	<i>M. musculus</i> hypothetisches 67,9 kDa Protein (364; 1,0 e <sup>-31</sup> ) <a href="#">Q91YZ8</a>
D 03	<i>D. melanogaster</i> "RE50273 full insert cDNA" (882; 4,2 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">AY089633</a>	<i>D. melanogaster</i> CG4944-PA Protein (460; 2,0 e <sup>-42</sup> ) <a href="#">Q97428</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 5, Klon CTD-2295C16 (458; 1,3 e <sup>-10</sup> ) <a href="#">AC026730</a>	—
D 04	<i>Calothrix</i> sp. D253 genomische DNA (Klon AG5) (326; 1,0 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">CSPAG5</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (88; 0,031) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (84; 0,081) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 10, Klon RP11-575A19 (336; 0,00011) <a href="#">AC069549</a>	Mycobacteriophage TM4 Gp2 Protein (66; 0,9994) <a href="#">Q9ZX75</a>
D 05	<i>M. sexta</i> "Prophenoloxidase Untereinheit 1, mRNA" (4432; 5,1 e <sup>-194</sup> ) <a href="#">AF003253</a>	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase Untereinheit 1 (913; 2,0 e <sup>-90</sup> ) <a href="#">Q44249</a>	<i>M. sexta</i> "Prophenoloxidase Untereinheit 1, mRNA" (4400; 1,4 e <sup>-192</sup> ) <a href="#">AF003253</a>	—
D 06	<i>Zea mays</i> patentierte Sequenz (389; 1,2 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">AX204869</a>	<i>D. melanogaster</i> "New-glue protein 2 precursor (NG-2)" (114; 3,1 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">P40139</a>	<i>B. mori</i> "retrotransposable element Pao long terminal repeat and reverse transcriptase gene" (659; 5,2 e <sup>-22</sup> ) <a href="#">BMIPAORTA</a>	<i>Bombyx mandarina</i> "gag and protease-like protein" (387; 1,1 e <sup>-34</sup> ) <a href="#">Q9NKV7</a>
D 07	<i>D. melanogaster</i> "profilin (chickadee) mRNA" (879; 4,4 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">DMCHICKA</a>	<i>D. melanogaster</i> Profilin ("Chickadee protein") (542; 4,1 e <sup>-51</sup> ) <a href="#">P25843</a>	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (484; 2,0 e <sup>-26</sup> ) <a href="#">AX284646</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Chromosom 3, BAC Klone:F1D9 (genomisch DNA) (175; 3,0 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">Q9LGZ9</a>



Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
D 08  D 08 RPT	<i>H. sapiens</i> ("human STS SHGC-51345, sequence tagged site" (215; 0,15) <u>HS1293222</u> )	<i>O. sativa</i> hypothetisches 27,0 kDa Protein (96; 0,38) <u>Q8S6Y1</u>	–  artifizielle, patentierte Sequenz (265; 0,18) <u>AX346499</u> ; <i>Hyalophora cecropia</i> Hemolin ("48 kDa C2-type immunoglobulin-like protein") (261; 0,26) <u>S78712</u>	–  <i>D. melanogaster</i> "male specific sperm protein Mst84Db" (54; 0,19) <u>Q01643</u>
D 09	<i>M. sexta</i> "juvenile hormone binding protein (hJHBP) gene, hJHBP-Snb allele" (1256; 4,5 e <sup>-49</sup> ) <u>AF527635</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (92; 0,0121) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (85; 0,068) <u>Q24333</u>	<i>M. sexta</i> "V-ATPase 110 kDa integral membrane subunit mRNA" (445; 6,8 e <sup>-10</sup> ) <u>AF173553</u>	<i>Trypanosoma brucei</i> CR3 Protein (68; 0,99) <u>Q33565</u>
D 10  D 10 RPT	<i>H. sapiens</i> "human DNA sequence from clone RP13-218H24 on chromosome X" (402; 4,8 e <sup>-08</sup> ) <u>AL662896</u>  <i>H. sapiens</i> "human DNA sequence from clone RP13-218H24 on chromosome X" (489; 5,5 e <sup>-12</sup> ) <u>AL662896</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (91; 0,010) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (78; 0,66) <u>Q24333</u>  <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein" (77; 0,92) <u>Q24333</u>	<i>H. sapiens</i> "BAC clone CTD-3045A19 from 7" (479; 2,1 e <sup>-12</sup> ) <u>AC079621</u>	–
D 11	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (370; 7,6 e <sup>-09</sup> ) <u>AX062918</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00078) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0045) <u>Q24333</u>	<i>Dictyostelium discoideum</i> Chromosom 2, "map 215673-367476 strain AX4" (263; 0,24) <u>AC114263</u>	–
D 12	<i>H. armigera</i> Actin A3b Gen (2124; 3,1 e <sup>-163</sup> ) <u>HAACTA3B</u> ; <i>M. sexta</i> Actin mRNA (3407; 2,5 e <sup>-147</sup> ) <u>MSACTINX</u>	<i>D. melanogaster</i> Actin-5C (1356; 2,3 e <sup>-137</sup> ) <u>P10987</u> ; <i>B. mori</i> zytoplasmatisches Actin A3 (1356; 2,3 e <sup>-137</sup> ) <u>P04829</u>	<i>H. armigera</i> Actin A3a Gen (3667; 1,4 e <sup>-159</sup> ) <u>HAACTA3A</u> ; <i>B. mori</i> zytoplasmatisches Actin (A3) Gen (3263; 2,7 e <sup>-141</sup> ) <u>BMU49854</u>	<i>H. armigera</i> Actin, zytoplasmatische A3A (959; 2,5 e <sup>-95</sup> ) <u>Q25010</u> ; <i>B. mori</i> zytoplasmatisches Actin A3 (954; 8,6 e <sup>-95</sup> ) <u>P04829</u>
E 01	<i>D. melanogaster</i> "LD43152 full length cDNA" (562; 3,5 e <sup>-16</sup> ) <u>AY069657</u>	<i>D. melanogaster</i> "probable serine/threonine-protein kinase pelle" (413; 1,9 e <sup>-37</sup> ) <u>Q05652</u>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 5, Klon RP11-186B13 (438; 1,7 e <sup>-09</sup> ) <u>AC026839</u>	–
E 02	unidentifizierter Organismus patentierte Sequenz (347; 1,2 e <sup>-09</sup> ) <u>AR070327</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (105; 1,2 e <sup>-06</sup> ) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0044) <u>Q24333</u>	<i>H. sapiens</i> "flow-sorted chromosome 6 Taql fragment" (451; 5,7 e <sup>-13</sup> ) <u>HSPA9E1</u>	–
E 03	<i>E. coli</i> "genomic DNA, Kohara clone #338 (42.1-42.5 min.)" (4674; 1,7 e <sup>-203</sup> ) <u>ECD830</u>	<i>E. coli</i> Cytochrom c-Typ Protein torY (1599; 4,0 e <sup>-163</sup> ) (P52005)	<i>E. coli</i> "genomic DNA, Kohara clone #338 (42.1-42.5 min.)" (4663; 5,3 e <sup>-203</sup> ) <u>ECD830</u>	<i>E. coli</i> Cytochrom c-Typ Protein torY (1599; 3,9 e <sup>-163</sup> ) (P52005)
E 04	<i>M. sexta</i> "eclosion hormone gene, exons 2 and 3, clone lambda D39" (700; 7,4 e <sup>-24</sup> ) <u>MSECLH3</u> ; <i>M. sexta</i> "serpin 1 gene, exons 1-10, including alternate exons 9A-Z" (625; 2,2 e <sup>-20</sup> ) <u>MS58361</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (106; 0,00030) <u>Q57344</u> ; <i>N. tabacum</i> BYJ6 (Fragment) (108; 0,0054) <u>Q57344</u>	<i>M. sexta</i> "hemolymph juvenile hormone binding protein precursor, gene" (442; 9,3 e <sup>-10</sup> ) <u>AF226857</u>	<i>H. sapiens</i> "Tetratricopeptide repeat protein 15 (TPR repeat protein 15) (CGI-87)" (110; 0,12) <u>TTCF HUMAN</u>
E 05	<i>Mimulus nasutus</i> "clone AAT374 microsatellite marker, sequence tagged site" (261; 3,0 e <sup>-07</sup> ) <u>AF012651</u>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (93; 0,0091) <u>Q57344</u> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (80; 0,21) <u>Q24333</u>	<i>H. sapiens</i> "BAC clone RP11-224B10 from 2" (456; 2,0 e <sup>-10</sup> ) <u>AC012492</u>	<i>Streptococcus agalactiae</i> "hypothetical protein" (70; 0,93) <u>Q8DX99</u>

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
E 06	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (254; 0,0019) <a href="#">AX062918</a>	<i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (86; 0,050) <a href="#">Q24333</a> ; Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (87; 0,11) <a href="#">Q57344</a>	<i>H. sapiens</i> "BAC clone RP11-238113 from 7" (291; 0,013) <a href="#">AC073071</a>	–
E 07	<i>N. tabacum</i> mRNA für BYJ15 (356; 4,2 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">NTAB5878</a>	<i>Onchocerca volvulus</i> "Pyrrolidone-rich antigen" (79; 5,4 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">Q61649</a>	<i>D. melanogaster</i> "SD02971 full length cDNA" (361; 4,7 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">AY052074</a>	<i>D. melanogaster</i> SD02971p Protein (205; 4,8 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">Q960G4</a>
E 08	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase (ppo) Gen (4322; 6,6 e <sup>-189</sup> ) <a href="#">MSPPO</a>	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase Vorläufer (pro-PO) (1003; 5,8 e <sup>-100</sup> ) <a href="#">Q25519</a>	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase (ppo) Gen (4258; 5,1 e <sup>-186</sup> ) <a href="#">MSPPO</a>	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase Vorläufer (pro-PO) (688; 4,5 e <sup>-80</sup> ) <a href="#">Q25519</a>
E 09	<i>M. sexta</i> "elongation factor-1 alpha mRNA" (4001; 4,1 e <sup>-174</sup> ) <a href="#">AF234571</a>	<i>D. melanogaster</i> EF1ALPHA100E protein (1279; 7,7 e <sup>-137</sup> ) <a href="#">Q9V9U8</a> ( <a href="#">P05303</a> )	<i>B. mori</i> mRNA für Elongationsfaktor 1 alpha" (3662; 1,1 e <sup>-158</sup> ) <a href="#">BMD13338</a> ; <i>M. sexta</i> Elongationsfaktor-1 alpha mRNA (2868; 1,1 e <sup>-122</sup> ) <a href="#">AF234571</a>	<i>B. mori</i> Elongationsfaktor 1-alpha (EF-1-alpha) (970; 9,4 e <sup>-105</sup> ) <a href="#">P29520</a>
E 10	<i>Picea abies</i> ATC Mikrosatelliten DNA, Klon EATC3H03 (300; 7,7 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">PAB296741</a> ;	<i>M. musculus</i> 1200013N13Rik Protein (124; 4,5 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q9CXZ8</a>	Klonierungsvektor (1900; 1,3 e <sup>-79</sup> ) <a href="#">U47947</a>	<i>D. melanogaster</i> CG3008 Protein (RE33807p) (515; 2,9 e <sup>-48</sup> ) <a href="#">Q9VR42</a>
E 10 RPT	Klonierungsvektor (1673; 5,0 e <sup>-80</sup> ) <a href="#">ARBLSKM</a>	<i>D. melanogaster</i> CG3008 Protein (RE33807p) (532; 4,7 e <sup>-50</sup> ) <a href="#">Q9VR42</a>		
E 11	–	–	<i>C. elegans</i> Cosmid Y47D3A (385; 4,2 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">CEY47D3A</a>	–
E 11 RPT	<i>H. sapiens</i> DNA Sequenz Chromosom 10, Klon RP11-359H22 (312; 0,0082) <a href="#">AL356100</a>	<i>Solanum tuberosum</i> "Lectin = Chitin-binding protein" (72; 0,81) <a href="#">Q9S8M0</a>		
E 12	<i>M. sexta</i> "mRNA for vacuolar ATPase subunit a (mva gene)" (713; 3,1 e <sup>-53</sup> ) <a href="#">MSE249390</a>	<i>M. sexta</i> "Vacuolar ATPase subunit a" (260; 3,3 e <sup>-39</sup> ) <a href="#">Q9U5M9</a>	<i>M. sexta</i> "mRNA for vacuolar ATPase subunit a (mva gene)" (1058; 3,1 e <sup>-40</sup> ) <a href="#">MSE249390</a>	<i>M. sexta</i> "Vacuolar ATPase subunit a" (370; 1,9 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">Q9U5M9</a>
F 01	<i>Neocallimastix patriciarum</i> patentierte Sequenz (280; 2,2 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">AX033851</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (88; 0,0053) <a href="#">Q57344</a> ; <i>N. tabacum</i> BYJ15 Protein (Fragment) (84; 011) <a href="#">Q24126</a>	<i>H. sapiens</i> "genomic sequence surrounding NotI site", Klon NL6-FO18R (233; 5,6 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">HSA333602</a>  <i>M. sexta</i> "V-ATPase 110 kDa integral membrane subunit mRNA"# (577; 2,8 e <sup>-18</sup> ) <a href="#">AF173553</a>	<i>Bromheadia finlaysoniana</i> Extensin (Fragment) (67; 4,8 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">O04216</a>
F 01 RPT				–
F 02	<i>H. sapiens</i> "genomic sequence surrounding NotI site", Klon NL6-FN15R (240; 2,6 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">HSA341632</a>	<i>D. discoideum</i> "Formin homology protein A" (162; 1,0 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">Q8IU42</a>	<i>H. sapiens</i> "BAC clone RP11-154L24 from 2" (495; 1,9 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">AC006985</a>	<i>H. sapiens</i> hypothetisches Protein (91; 0,96) <a href="#">Q9HBQ9</a>
F 02 RPT	<i>D. melanogaster</i> "Gart polypeptide gene, alternatively spliced and pupal cuticle protein gene" (1033; 7,1 e <sup>-39</sup> ) <a href="#">DMGART1</a>	<i>D. melanogaster</i> "Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3" (505; 1,9 e <sup>-57</sup> ) <a href="#">PUR2_DROME</a> ( <a href="#">P00967</a> )		
F 03	<i>Glycine max</i> patentierte Sequenz (385; 1,6 e <sup>-10</sup> ) <a href="#">AX406874</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (108; 4,0 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (102; 0,00017) <a href="#">Q24333</a>	<i>M. musculus</i> RNaseP Protein p30 (Rpp30) mRNA (351; 8,3 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">U95123</a>	<i>D. melanogaster</i> CG11606-PA Protein (GH06023p) (391; 4,0 e <sup>-31</sup> ) <a href="#">Q9VPM0</a>
F 03 RPT	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (306; 6,9 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">AX062918</a>	<i>D. melanogaster</i> CG11606-PA Protein (GH06023p) (328; 2,0 e <sup>-28</sup> ) <a href="#">Q9VPM0</a>		

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
F 04	<i>D. melanogaster</i> "mRNA for elastin-like protein" (323; 1,3 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">DMELAST</a>	<i>M. musculus</i> "Proline-rich protein MP-3" (Fragment) (112; 3,3 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">PMP3_MOUSE</a> (P05143)	<i>B. mori</i> DNA, Klon TREST1 (387; 2,2 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">D55702</a>	<i>B. mori</i> Gag Protein (441; 6,7 e <sup>-40</sup> ) <a href="#">O01418</a>
F 04 RPT	<i>Chondrus crispus</i> patentierte Sequenz (262; 0,00042) <a href="#">AX047064</a>	<i>B. mori</i> Gag Protein (230; 7,2 e <sup>-21</sup> ) <a href="#">O01418</a>		
F 05	<i>M. sexta</i> "juvenile hormone binding protein (hJHBP) gene, hJHBP-Snb allele" (514; 1,7 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">AF527635</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00073) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0042) <a href="#">Q24333</a>	<i>M. sexta</i> "eclosion hormone gene, exons 2 and 3, Klon lambda D39" (509; 3,5 e <sup>-13</sup> ) <a href="#">MSECLH3</a> ; <i>M. sexta</i> "serpin 1 gene, exons 1-10, including alternate exons 9A-Z" (471; 3,4 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">MS58361</a>	–
F 06	<i>D. melanogaster</i> "GH24627 full length cDNA" (356; 1,2 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">AY051605</a>	<i>D. melanogaster</i> CG8576 Protein (353; 4,4 e <sup>-31</sup> ) <a href="#">Q9VS60</a>	<i>M. sexta</i> "hemolymph juvenile hormone binding protein (hJHBP) gene, hJHBP-Snb allele" (474; 1,9 e <sup>-11</sup> ) <a href="#">AF527635</a>	<i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid polyhedrosis Virus (OpMNPV) hypothetisches 8,9 kDa Protein (65; 0,9999) <a href="#">O10376</a>
F 07	<i>Platyptilia</i> sp. L11 18S ribosomale RNA, Gen (4197; 3,8 e <sup>-183</sup> ) <a href="#">AF423784</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (106; 0,00033) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (96; 0,0041) <a href="#">Q24333</a>	<i>Lymantria dispar</i> Vitellogenin-Gen (298; 0,0058) <a href="#">U90756</a> <i>Hyalophora cecropia</i> Kutikula-Protein 12, Gen (279; 0,038) <a href="#">HC08026</a>	<i>Methanococcus jannaschii</i> hypothetisches Protein MJ0230 (66; 0,9992) <a href="#">Y230_METJA</a> ( <a href="#">Q57683</a> )
F 08	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (348; 7,5 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">AX337023</a>	<i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (116; 2,9 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q24333</a> ; Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (104; 0,00060) <a href="#">Q57344</a>	<i>P. falciparum</i> 3D7 "chromosome 2 section 35 of 73 of the complete sequence" (572; 5,4 e <sup>-18</sup> ) <a href="#">AE001398</a>	–
F 09	unidentifizierter Organismus patentierte Sequenz (416; 4,2 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">AR087649</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (106; 0,00037) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (106; 0,00037) <a href="#">Q24333</a>	<i>Penicillium marneffei</i> STS, Klon pm4a6.g. (186; 0,62) <a href="#">PM4A6G</a>	<i>A. thaliana</i> F24O1.6 Protein (63; 2,0 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q9MAV4</a>
F 09 RPT			–	<i>O. sativa</i> "protein similar to mouse ankyrin 3" (92; 0,67) <a href="#">Q9SNU0</a>
F 10	<i>Platynereis dumerilii</i> partial mRNA for Pax6 protein (352; 8,0 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">PDU316541</a>	<i>D. melanogaster</i> "Vanin-like protein 2 precursor" (CG32751-PA Protein) (207; 9,1 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">VNL2_DROME</a> ( <a href="#">AAN09160</a> )	<i>D. melanogaster</i> mitochondriale A+T Region (563; 8,2 e <sup>-16</sup> ) <a href="#">MIDMMU115</a>	–
F 10 RPT	<i>D. melanogaster</i> "mRNA for vanin-like protein" (496; 1,1 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">DME276261</a>	<i>D. melanogaster</i> CG32751-PA (402; 2,8 e <sup>-36</sup> ) <a href="#">AAN09160</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Vanin-like protein 1 precursor" (374; 4,0 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">VNL1_DROME</a> ( <a href="#">Q9NFP1</a> )		
F 11	<i>D. melanogaster</i> "calponin-like protein Chd64 (Chd64) mRNA" (1430; 4,7 e <sup>-58</sup> ) <a href="#">AF217286</a>	<i>D. melanogaster</i> CG14996-PB Protein ("Calponin-like protein Chd64") (810; 1,6 e <sup>-79</sup> ) <a href="#">Q9VZ11</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 10, Klon RP11-506M13 (686; 4,1 e <sup>-23</sup> ) <a href="#">AC068139</a>	<i>Borrelia parkeri</i> BdrC1-Protein (83; 0,998) <a href="#">Q9RGB6</a>
F 12	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (370; 7,5 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">AX062918</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (104; 0,00061) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (98; 0,0028) <a href="#">Q24333</a>	<i>Astasia longa</i> komplettes Chloroplasten-Genom (280; 0,032) <a href="#">ALO294725</a>	–

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
G 01	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (1951; 8,6 e <sup>-82</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; <i>B. mori</i> EN16b mRNA für Annexin (1910; 7,7 e <sup>-80</sup> ) <a href="#">AB041637</a> Annexin IX-C (2078; 2,6 e <sup>-87</sup> ) <a href="#">AB030498</a>	<i>B. mori</i> Annexin (EN16B) (551; 3,7 e <sup>-80</sup> ) <a href="#">Q9GNG6</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (545; 1,6 e <sup>-79</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (545; 1,6 e <sup>-79</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a>	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (1903; 1,9 e <sup>-116</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (2078; 2,6 e <sup>-87</sup> ) <a href="#">AB030498</a>	<i>B. mori</i> Annexin IX-C (660; 2,0 e <sup>-83</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> <i>B. mori</i> Annexin IX-A (641; 2,0 e <sup>-81</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a>
G 02	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (2398; 9,1 e <sup>-102</sup> ) <a href="#">AB030498</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (2393; 9,3 e <sup>-102</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-B (2393; 1,1 e <sup>-101</sup> ) <a href="#">AB030497</a>	<i>B. mori</i> Annexin IX-A (1122; 1,4 e <sup>-112</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (1122; 1,4 e <sup>-112</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-B (1122; 1,4 e <sup>-112</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a>	<i>B. mori</i> EN16b mRNA für Annexin (745; 1,0 e <sup>-45</sup> ) <a href="#">AB041637</a>	<i>H. sapiens</i> hypothetisches Protein (KPNA4 Protein) (72; 0,81) <a href="#">Q96KW7</a>
G 03	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-B (1248; 5,9 e <sup>-50</sup> ) <a href="#">AB030497</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (1248; 7,9 e <sup>-50</sup> ) <a href="#">AB030498</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (1248; 1,0 e <sup>-49</sup> ) <a href="#">AB030496</a>	<i>B. mori</i> Annexin IX-B (354; 1,5 e <sup>-55</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (354; 1,5 e <sup>-55</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (354; 1,5 e <sup>-55</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a>	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-B (889; 5,0 e <sup>-33</sup> ) <a href="#">AB030497</a>	—
G 04	<i>B. mori</i> EN16 mRNA für Annexin (1541; 3,5 e <sup>-63</sup> ) <a href="#">AB041636</a> ; <i>B. mori</i> EN16b mRNA für Annexin (1541; 3,5 e <sup>-63</sup> ) <a href="#">AB041637</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (1532; 7,2 e <sup>-63</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-B (1532; 8,8 e <sup>-63</sup> ) <a href="#">AB030497</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (1532; 1,2 e <sup>-62</sup> ) <a href="#">AB030498</a>	<i>B. mori</i> Annexin IX-B (258; 3,0 e <sup>-29</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (258; 3,0 e <sup>-29</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (258; 3,0 e <sup>-29</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a> ; <i>B. mori</i> Annexin (EN16B) (257; 3,9 e <sup>-29</sup> ) <a href="#">Q9GNG6</a>	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (332; 10 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">AB030498</a>	<i>S. cerevisiae</i> ORF YBL091C (Fragment) (70; 0,78) <a href="#">P89493</a>
G 04 RPT			<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (216; 0,14) <a href="#">AX284814</a>	<i>T. brucei</i> hypothetisches 17,4 kDa Protein (Tb927.1.1280) (78; 0,9991) <a href="#">Q9N8X5</a>
G 05	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (3083; 6,4 e <sup>-133</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; Annexin IX-B (3083; 7,8 e <sup>-133</sup> ) <a href="#">AB030497</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (3083; 1,0 e <sup>-132</sup> ) <a href="#">AB030498</a> <i>B. mori</i> EN16b mRNA für Annexin (3011; 1,4 e <sup>-129</sup> ) <a href="#">AB041637</a>	<i>B. mori</i> Annexin (EN16B) (1175; 3,4 e <sup>-118</sup> ) <a href="#">Q9GNG6</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (1167; 2,4 e <sup>-117</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (1167; 2,4 e <sup>-117</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-B (1167; 2,4 e <sup>-117</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a>	<i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-A (1689; 1,7 e <sup>-107</sup> ) <a href="#">AB030496</a> ; Annexin IX-B (1689; 2,1 e <sup>-107</sup> ) <a href="#">AB030497</a> ; <i>B. mori</i> mRNA für Annexin IX-C (1893; 5,8 e <sup>-79</sup> ) <a href="#">AB030498</a>	<i>B. mori</i> Annexin IX-C (706; 1,7 e <sup>-68</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (687; 1,7 e <sup>-66</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-B (677; 2,0 e <sup>-65</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a>
		<i>B. mori</i> Annexin (EN16B) (163; 4,2 e <sup>-16</sup> ) <a href="#">Q9GNG6</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-B (157; 4,2 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">Q9NL60</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-C (157; 4,2 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">Q9NL59</a> ; <i>B. mori</i> Annexin IX-A (157; 4,2 e <sup>-15</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a> ;  <i>B. mori</i> Annexin IX-A (447; 4,9 e <sup>-44</sup> ) <a href="#">Q9NL61</a>	<i>B. mori</i> EN16b mRNA für Annexin (701; 3,2 e <sup>-36</sup> ) <a href="#">AB041637</a>	—
G 07	<i>M. sexta</i> Lysozym ("fat body, mRNA partial, 839 nt") (2686; 1,3 e <sup>-158</sup> ) <a href="#">S70589</a>	<i>M. sexta</i> Lysozym (Fragment) (286; 9,6 e <sup>-40</sup> ) <a href="#">Q9TWY1</a>	<i>M. sexta</i> Lysozym ("fat body, mRNA partial, 839 nt") (3277; 3,0 e <sup>-141</sup> ) <a href="#">S70589</a>	<i>M. sexta</i> Lysozym (Fragment) (286; 9,6 e <sup>-40</sup> ) <a href="#">Q9TWY1</a>

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
G 08	<i>M. sexta</i> "heat shock cognate 70 protein mRNA" (3935; 2,2 e <sup>-171</sup> ) <a href="#">AF194819</a>	<i>B. mori</i> "Heat shock cognate protein" (1077; 8,4 e <sup>-108</sup> ) <a href="#">Q8N0P2</a> ; <i>M. sexta</i> "Heat shock 70 kDa protein cognate 4 (Hsc 70-4)" (1073; 2,2 e <sup>-107</sup> ) <a href="#">HS7D_MANSE (Q9U639)</a>	<i>M. sexta</i> "heat shock cognate 70 protein mRNA" (4209; 9,6 e <sup>-184</sup> ) <a href="#">AF194819</a>	<i>M. sexta</i> "Heat shock 70 kDa protein cognate 4 (Hsc 70-4)" (1147; 3,0 e <sup>-115</sup> ) <a href="#">HS7D_MANSE (Q9U639)</a>
G 09	unidentifizierter Organismus patentierte Sequenz (351; 3,7 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">AR184181</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (103; 0,00072) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (98; 0,0026) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 13, Sequenz Klon RP13-472L18 (270; 0,12) <a href="#">AL645495</a>	<i>Aspergillus niger</i> Polyketidsynthase (Fragment) (65; 0,99991) <a href="#">Q96WC7</a>
G 10	<i>Gallus gallus</i> "chicken microsatellite markers STS genomic, sequence tagged site" (327; 5,4 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">G54468</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (89; 0,0172) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (77; 0,84) <a href="#">Q24333</a>	<i>H. sapiens</i> "human variable number tandem repeat (VNTR) region, allele 14R2 3' to collagen type II (COL2A1) gene" (343; 8,5 e <sup>-96</sup> ) <a href="#">HSCOLREPN</a>	–
G 10 RPT	<i>H. sapiens</i> "STS DM1-5A3s clone DM1-5A3, sequence tagged site" (227; 0,036) <a href="#">G35080</a>	–		
G 11	<i>B. mori</i> mRNA für Lektin (1465; 3,5 e <sup>-59</sup> ) <a href="#">BMBOLE</a>	<i>B. mori</i> Hemocytin Vorläufer ("Humoral lectin") (770; 1,8 e <sup>-73</sup> ) <a href="#">HMCT_BOMMO (P98092)</a>	<i>B. mori</i> mRNA für Lektin (768; 4,4 e <sup>-27</sup> ) <a href="#">BMBOLE</a>	<i>B. mori</i> Hemocytin Vorläufer ("Humoral lectin") (341; 6,3 e <sup>-28</sup> ) <a href="#">HMCT_BOMMO (P98092)</a>
G 12	unklassifizierter Organismus patentierte Sequenz (1568; 5,4 e <sup>-64</sup> ) <a href="#">I08658</a> ; <i>H. cecropia</i> "Cecropia moth mRNA for acidic attacin" (1566; 6,7 e <sup>-64</sup> ) <a href="#">HCAT02</a>	<i>H. cecropia</i> Attacin E und F Vorläufer (Immunprotein P5) (785; 7,3 e <sup>-77</sup> ) <a href="#">ATTE_HYACE P01513</a>	unbestimmter Organismus patentierte Sequenz (1591; 5,0 e <sup>-65</sup> ) <a href="#">I08658</a> ; <i>H. cecropia</i> "Cecropia moth mRNA for acidic attacin" (1589; 6,1 e <sup>-65</sup> ) <a href="#">HCAT02</a>	<i>H. cecropia</i> Attacin E und F Vorläufer (Immunprotein P5) (797; 3,8 e <sup>-78</sup> ) <a href="#">ATTE_HYACE P01513</a>
H 01	<i>M. sexta</i> "soluble guanylyl cyclase alpha-1 subunit mRNA" (540; 1,0 e <sup>-14</sup> ) <a href="#">AF062750</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (117; 2,3 e <sup>-05</sup> ) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (110; 0,00013) <a href="#">Q24333</a>	<i>M. sexta</i> "soluble guanylyl cyclase alpha-1 subunit mRNA" (565; 1,3 e <sup>-16</sup> ) <a href="#">AF062750</a>	–
H 02	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (368; 8,5 e <sup>-09</sup> ) <a href="#">AX337023</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (110; 0,00013) <a href="#">Q57344</a> ; <i>N. tabacum</i> BYJ6 Protein (Fragment) (114; 0,0011) <a href="#">Q24127</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 19, Klon RP11-1137G4 (496; 2,4 e <sup>-12</sup> ) <a href="#">AC025278</a>	<i>S. cerevisiae</i> hypothetisches 12,0 kDa Protein (74; 0,65) <a href="#">Q04597</a>
H 03	<i>D. melanogaster</i> 3L BAC RP98-11J11 (712; 2,7 e <sup>-24</sup> ) <a href="#">AC093121</a>	<i>D. melanogaster</i> CG1216-PA Protein (601; 2,3 e <sup>-57</sup> ) <a href="#">Q9W0U1</a>	<i>H. sapiens</i> Chromosom 19, Klon RP11-1137G4 (640; 4,8 e <sup>-21</sup> ) <a href="#">AC025278</a>	<i>P. falciparum</i> ORF78 Protein (72; 0,83) <a href="#">Q25821</a>
H 04	<i>Platyptilia</i> sp. L11 18S ribosomale RNA, Gen (4285; 4,1 e <sup>-187</sup> ) <a href="#">AF423784</a>	<i>Metarhizium anisopliae</i> Ubiquitin conjugating enzyme (104; 0,00060) <a href="#">Q94098</a>	<i>G. mellonella</i> DNA für 18S ribosomale RNA (1454; 2,9 e <sup>-59</sup> ) <a href="#">GMRRNA18S</a>	<i>R. norvegicus</i> Huntingtin (Fragment) (58; 0,052) <a href="#">Q9Z118</a>
H 04 RPT			<i>Platyptilia</i> sp. L11 18S ribosomale RNA, Gen (4778; 2,2 e <sup>-209</sup> ) <a href="#">AF423784</a>	<i>Nasalis larvatus</i> Protamine P1 (69; 0,98) <a href="#">Q9GKQ3</a>
H 05	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (257; 0,0011) <a href="#">AX337023</a>	–	–	–
H 05 RPT	–	–		
H 06	<i>D. melanogaster</i> "RE10864 full insert cDNA" (1945; 2,1 e <sup>-81</sup> ) <a href="#">AY118367</a>	<i>D. virilis</i> ATP Synthase beta-Kette, mitochondrialer Vorläufer (Fragment) (447; 4,8 e <sup>-67</sup> ) <a href="#">ATPB_DROVI Q24751</a>	<i>H. sapiens</i> "ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:5231 IMAGE:2900336)" (2476; 2,8 e <sup>-109</sup> ) <a href="#">BC016512</a>	<i>D. melanogaster</i> ATPSYN-beta Protein (1091; 2,6 e <sup>-109</sup> ) <a href="#">ATPB_DROME (Q9V494)</a>

Klon Nr.	5' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	5' WU-blastx (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastn (High Score; P) Accession no.	3' WU-blastx (High Score; P) Accession no.
H 07	<i>M. sexta</i> Lacunin mRNA (2978; 6,5 e <sup>-127</sup> ) <a href="#">AF078161</a>	<i>M. sexta</i> Lacunin Vorläufer (830; 7,7 e <sup>-80</sup> ) <a href="#">Q9U8G8</a>	<i>M. sexta</i> Lacunin mRNA (3362; 1,1 e <sup>-170</sup> ) <a href="#">AF078161</a>	<i>B. mandarina</i> ATP Synthase F0 Untereinheit 8 (69; 0,96) <a href="#">Q8SEX7</a>
H 08	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (352; 5,3 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">AX062918</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (108; 0,00022) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (100; 0,0016) <a href="#">Q24333</a>	unbestimmter Organismus patentierte Sequenz (393; 2,7 e <sup>-10</sup> ) <a href="#">AR174092</a>	<i>O. sativa</i> Hypothetisches Protein B1136H02.30 (127; 1,6 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">Q6EPW4</a>
H 09	<i>N. tabacum</i> mRNA für BYJ15 (358; 1,6 e <sup>-08</sup> ) <a href="#">NTAB5878</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (108; 0,00016) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (100; 0,0012) <a href="#">Q24333</a>	Klonierungsvektor (1246; 1,2 e <sup>-48</sup> ) <a href="#">PVPIJ2581</a>	<i>M. musculus</i> Receptor activity modifying protein 1 (104; 0,019) <a href="#">Q8VII7</a>
H 10	<i>Calothrix</i> sp. D253 genomische DNA Klon AG13 (305; 6,0 e <sup>-06</sup> ) <a href="#">CSPAG13</a>	Klonierungsvektor LacZ alpha Peptid (88; 0,026) <a href="#">Q57344</a> ; <i>D. melanogaster</i> "Elastin like protein (Fragment)" (77; 0,88) <a href="#">Q24333</a>	artifizielle, patentierte Sequenz (237; 0,97) <a href="#">AX277907</a>	<i>D. melanogaster</i> CG9068-PA Protein (89; 0,037) <a href="#">Q9V7M6</a>
H 10 RPT			<i>M. musculus</i> Chromosom 11, Klon RP23-5N19 (278; 0,056) <a href="#">AL669826</a>	<i>D. melanogaster</i> CG9068-PA Protein (264; 1,2 e <sup>-26</sup> ) <a href="#">Q9V7M6</a>
H 11	<i>H. sapiens</i> patentierte Sequenz (339; 2,2 e <sup>-07</sup> ) <a href="#">AX062918</a>	<i>H. sapiens</i> BG153O3.1 Protein ("Similar to C.elegans hemicentin") (237; 2,3 e <sup>-21</sup> ) <a href="#">Q9H1X9</a>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> patentierte Sequenz (194; 0,67) <a href="#">A63903</a>	<i>Penaeus japonicus</i> Deoxyribonuclease I Vorläufer (83; 0,36) <a href="#">Q9U5L8</a>
H 11 RPT			<i>X. dendrorhous</i> patentierte Sequenz (177; 0,9999) <a href="#">A63903</a>	<i>D. melanogaster</i> CG14120-PA Protein (264; 1,2 e <sup>-26</sup> ) <a href="#">Q9V7M6</a>
H 12	<i>D. melanogaster</i> "LD24904 full length cDNA" (1939; 9,2 e <sup>-82</sup> ) <a href="#">AY060375</a>	<i>Capra ibex ibex</i> ATP-Synthase-Protein 8 (ATPase Untereinheit 8) (A6L) (66; 0,9997) <a href="#">ATP8_CAPII</a> ( <a href="#">Q9MQK2</a> )	artifizielle, patentierte Sequenz (260; 0,0050) <a href="#">AX344203</a>	<i>Capra ibex ibex</i> ATP-Synthase-Protein 8 (ATPase Untereinheit 8) (A6L) (66; 0,9996) <a href="#">ATP8_CAPII</a> ( <a href="#">Q9MQK2</a> )







## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Tina Trenczek für die Überlassung des Promotionsthemas, für stimulierende wissenschaftliche Diskussionen und besonders für ihre Tipps zur richtigen Zeit bedanken.

Prof. Dr. Adriaan Dorrestein danke ich für die Übernahme des Amtes als Zweitgutachter der vorliegenden Arbeit und die freundliche Atmosphäre, die er im Institut verbreitete.

Epecially, I would like to thank Prof. Dr. István Andó and Dr. Éva Kurucz of the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Science in Szeged (Hungary), who gave me the opportunity to work and learn in their laboratory, where the first steps of the Annexin-project were performed.

Mein besonderer Dank gilt allen Angehörigen des Instituts für Allgemeine und Spezielle Zoologie der JLU Gießen – den rezenten sowie auch denjenigen, die uns bereits verlassen haben. Ich danke vor allem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für Ihre vielfältige Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit, bei der Elektronenmikroskopie, bei Fotoarbeiten, am PC, für Tipps und Kniffe bei den Versuchen oder einfach für ihre Bereitschaft, über scheinbar nicht eindeutige Versuchsergebnisse zu diskutieren.

Vielen Dank meinen Korrekturleserinnen und -lesern!

Ein ganz besonderer Dank geht an alle meine Freunde, die mich durch aufmunternde Worte oder ganz pragmatisch unterstützt haben v. a. in der Endphase, insbesondere Isabel Bommer und Christoph Scherfer.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (TR 254/2-1) sowie durch ein Stipendium für Ingenieur- und Naturwissenschaftlerinnen im Rahmen des Hochschul- und Wissenschaftsprogrammes unterstützt.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Gießen, im Januar 2005

